No. 4 (2002)
LIBRARY
NOAA, NMFS Honolulu Lab.
2570 Dole St.
Honolulu, Hawaii 96822-2396

ISSN 1346-9894
水研センター研報
Bull.Fish.Res.Agen.

水産総合研究センター
研究報告

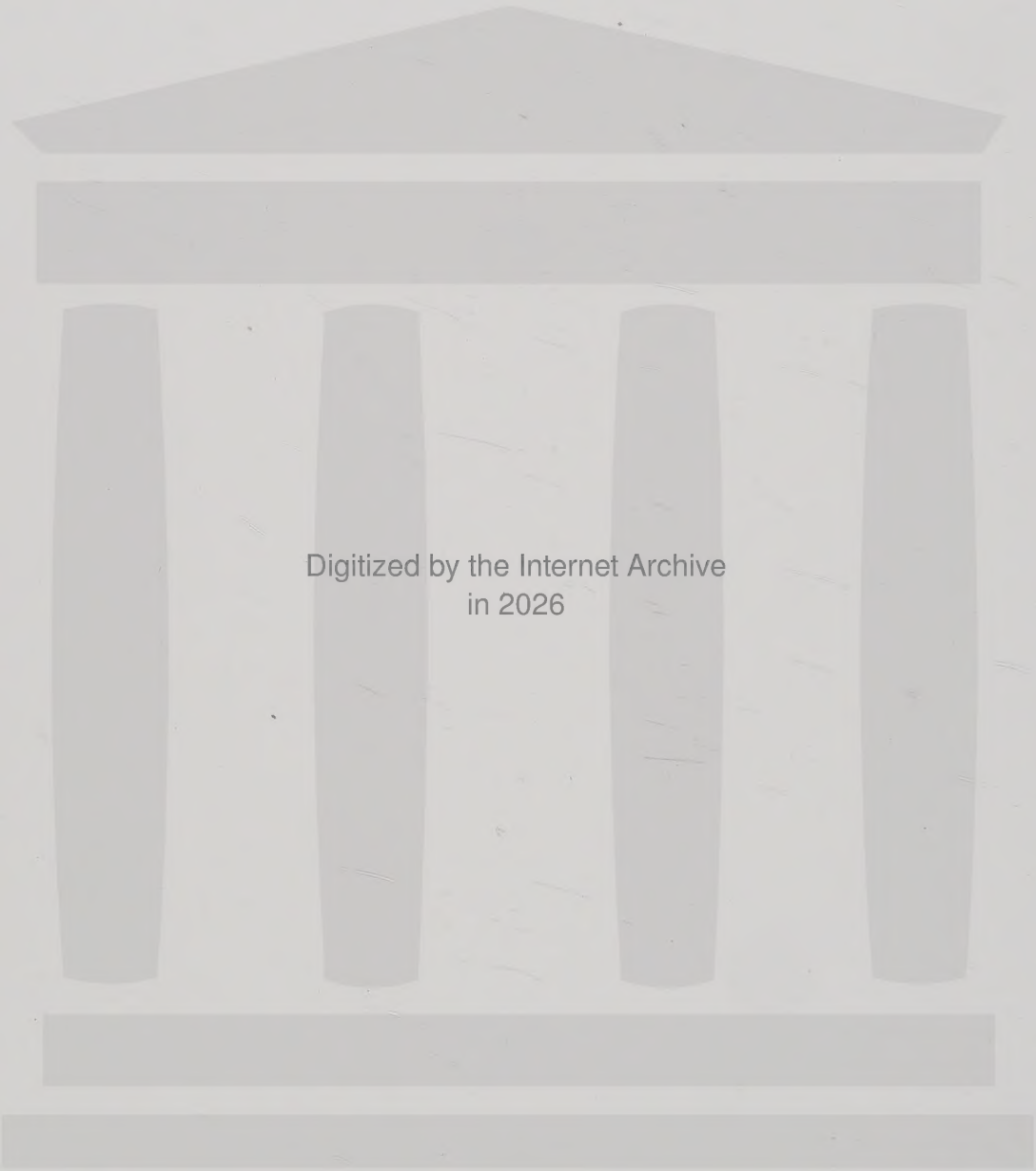
4
平成14年9月

BULLETIN OF FISHERIES RESEARCH AGENCY

No. 4
September 2002

NMFS Honolulu Library
Received 21 Feb 2003
for Library Use Only

独立行政法人 水産総合研究センター
神奈川県横浜市
FISHERIES RESEARCH AGENCY
Yokohama, Kanagawa, Japan



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/bulletin-japan-fisheries-research-education-agency_2002-09_4

水産総合研究センター研究報告

第4号　　平成14年9月

目　　次

（報　文）

亜熱帯性の海草のシュート密度，シュート構造，摂餌痕の地域変異（英文）
高田　宜武・阿部　寧 …… 1

ヒラメ稚魚の成長と摂餌量の関係に与える体重と水温の影響（英文）
福田　雅明・佐古　浩・重田　利拓・柴田　玲奈 …… 11

サザエ*Turbo* (*Batillus*) *cornutus*とコシダカサザエ *Turbo*（*Marmarostoma*）*stenogyrus* の原殻形態の比較（英文）
河野　悌昌・山川　紘 …… 19

広島湾におけるアマモ草体中の炭素および窒素総量
寺脇　利信・玉置　仁・西村　真樹・吉川　浩二・吉田　吾郎 …… 25

宮島干潟におけるメイオベントス動物群－特に線虫類の現存量について－
辻野　睦・吉田　吾郎・内田　卓志 …… 33

（博士号論文）

遺伝資源としてのマガキ *Crassostrea gigas* の特性評価と保存に関する研究
薄　浩則 …… 40

（和文要旨） …… 105

水研センター研報，第4号，1−10，平成14年
Bull. Fish. Res. Agen. No. 4, 1-10, 2002

Local variations in shoot density, shoot morphology, and bite mark frequency of subtropical seagrasses in Japan

Yoshitake TAKADA* and Osamu ABE*

Abstract This study demonstrated local variations in seagrass species composition, biomass, shoot density, shoot morphology and the frequency of bite marks in seagrass leaves at coastal sites in the Yaeyama Islands, subtropical Japan. Seven seagrass species (*Zostera japonica, Halodule pinifolia, H. uninervis, Cymodocea rotundata, C. serrulata, Thalassia hemprichii* and *Halophila ovalis*) were sampled, and *T. hemprichii* was the most dominant. Total biomass did not vary between the four sampling sites, but there were considerable local variations in shoot density and shoot morphology of the larger three species (*C. rotundata, C. serrulata* and *T. hemprichii*). At the sites with a low shoot density (19-29 shoots per 625cm^2), the shoots of *T. hemprichii* had a lower number of leaves, wider and longer leaves, and a longer "sheath+erect shoot" length than the shoots at the sites with a high shoot density (44-93 shoots). The frequencies of bite marks on leaves of *C. rotundata* and *T. hemprichii* varied between sites, but they did not correspond to local variations in the leaf length structure. The relation between the seagrass shoot morphology and the balance of production and consumption requires further clarification.

Key words: Seagrass, density, size structure, herbivory, biomass

Seagrass beds provide habitats for many types of algae and animals. Density and diversity of organisms associated with seagrass beds are affected by the shoot density (Orth *et al.*, 1984; Edgar *et al.*, 1994), leaf length (Horinouchi *et al.*, 1999), leaf morphology (Trautman and Borowitzka, 1999), and heterogeneity of the seagrass bed structure (Horinouchi and Sano, 1999). On the other hand, recent studies indicate that large herbivores (i.e. fishes, sea urchins, and green turtles) consume considerable quantities of seagrass leaves (Thayer *et al.*, 1984; Valentine and Heck, 1999), which in turn affects the shoot density and leaf length structure of the seagrass bed. Therefore, variation in seagrass bed structures with an evaluation of leaf herbivory is important as basic information to understand the possible relationships between local variations in seagrass bed structure and its associated organisms.

Tropical and subtropical seagrass beds in the western Pacific usually form mixed species vegetations (Brouns, 1987; Poiner *et al.*, 1989; Tomasko *et al.*, 1993; Vermaat *et al.*, 1995; Bach *et al.*, 1998; Terrados *et al.*, 1998). Spatial variations in species composition have been observed not only on a geographic scale (Mukai, 1993), but also on local scales (Kanamoto and Watanabe, 1981; de Iongh *et al.*, 1995). In subtropical Japan, including the Yaeyama Islands, several species of seagrass occur in shallow coastal lagoons and they usually form mixed seagrass beds (Nozawa, 1972; Tsuda and Kamura, 1990). In the Yaeyama Islands, a quantitative study on the seagrass community was carried out on a small scale (<10km) at the Nagura Bay

2002年1月22日受理（Received on January 22, 2002）
水産総合研究センター業績 A 第17号（Contribution No. A 17 from the Fisheries Research Agency）
* 西海区水産研究所石垣支所 〒907-0451 沖縄県石垣市桴海大田148-446 (Ishigaki Tropical Station, Seikai National Fisheries Research Institute, Fukai-Ota 148-446, Ishigaki 907-0451, Japan)

(Kanamoto and Watanabe, 1981), but local variations over a larger scale (10-100km) were not investigated. Kanamoto and Watanabe (1981) suggested that the species composition of subtropical seagrass beds varies primarily with depth, with the maximum diversity around the Mean Low Water Spring (MLWS) tide level. Therefore, comparison between seagrass samples around the MLWS would be a good indicator of the local variations in seagrass vegetation.

The objectives of this work are three-fold. First, seagrass species compositions on the coast of the Yaeyama Islands, subtropical Japan, were determined to substantiate earlier reports of mixed-species vegetation. Second, the range of local variations in shoot density and shoot morphology (number of leaves per shoot, leaf width, leaf length, and "sheath+erect shoot" length) of seagrass are evaluated within the mixed vegetation at the MLWS level in lagoons. Third, local variations of the impact of herbivory were assessed by observing the frequency of bite marks on seagrass leaves.

Materials and Methods

Quantitative seagrass sampling was carried out at four coral lagoons around the Yaeyama Islands (124°N, 24°E, Fig. 1) in July, 1997: two sites (Ibaruma and Urasoko) on the northern side of Ishigaki Island and two sites (Nagahama and Takahama) on the southern side of Iriomote Island. Nagahama and Takahama are more exposed to oceanic swells than Ibaruma and Urasoko because the distances between the reef edge and the shore are less at Nagahama and Takahama (0.2-0.4km) than at Ibaruma and Urasoko (1.7-2.4km).

To minimize any possible effects of microtopographic variations between samples, at each site a sampling area (20m diameter) was selected at the center of the seagrass bed, where the sandy bottom was flat (heterogeneity of height <5cm, mainly by mounds of infauna) at a depth of 0-30cm below the MLWS. Four replicate samples of seagrasses were taken using a quadrat (25×25cm, 15cm depth) randomly set within each sampling area.

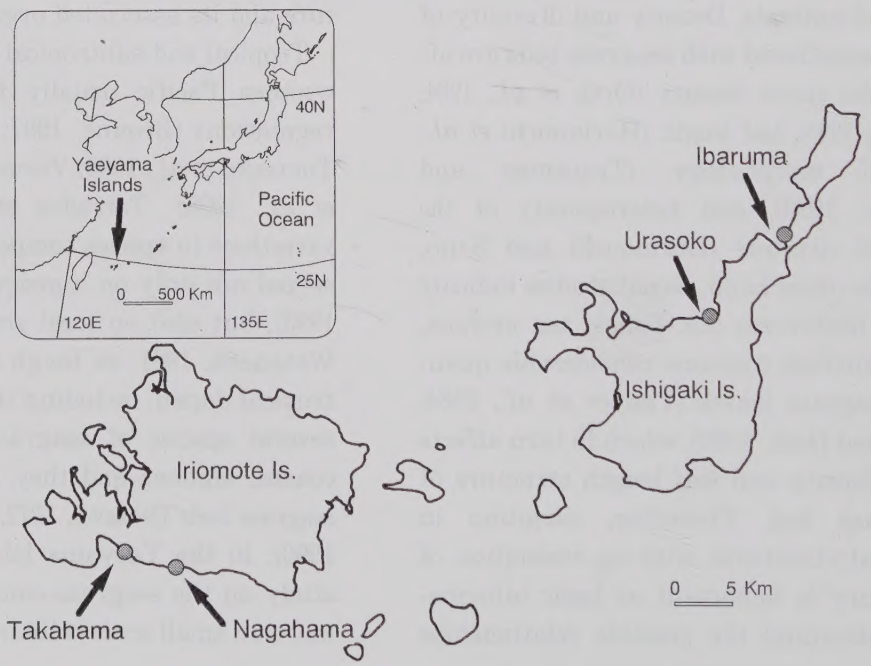


Fig. 1. Locations of the four study sites (Ibaruma, Urasoko, Nagahama and Takahama) in the Yaeyama Islands, Japan.

Seagrass samples were sorted to species. Live and dead tissues were separated and only live tissues were used in the following analyses. Live tissues were separated into three parts (leaf, sheath + erect shoot, and horizontal rhizome) and their dry weights (60℃, 24hours) were measured.

For the larger three species (*Cymodocea rotundata* Ehrenberg and Hemprich ex Ascherson, *C. serrulata* (R. Brown) Ascherson and Magnus, and *Thalassia hemprichii* (Ehrenberg) Ascherson), the number of shoots per quadrat and the number of leaves per shoot were counted. Budding shoots without any leaves were excluded from the analysis. The length of "sheath+erect shoot" was measured for each shoot. The length and the width of the leaves were measured in the order of the leaf in each shoot (Fig. 2). Mostly, the width of the leaves was the same over whole positions on a leaf and leaves within a shoot. Otherwise, the maximum width of the leaves within a shoot was measured. Leaf areas of each species per quadrat were estimated by summing up the products of leaf length and width. Four types of leaves were recognized according to bite marks (Fig. 2) : (1) no bite marks, (2) intact leaf length with round bite marks, (3) leaf shortened by round bite marks, (4) leaf shortened by straight or irregular shaped bite marks. For *C. rotundata*, the leaf types 3 and 4 were not distinguishable because of its narrower leaf width. These bite marks may be made by various herbivores including amphipods and fishes (McClanahan *et al.*, 1994). In the Yaeyama Islands, preliminary observations showed that green turtles (*Chelonia mydas* (Linnaeus)) make straight bites and sea urchins (*Tripneustes gratilla* (Linnaeus)) make irregular shaped bite marks.

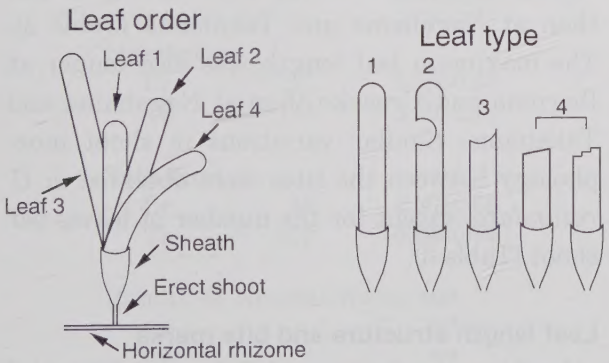


Fig. 2. Schematic representations of seagrass leaf order and leaf types with bite marks.

Results

Species composition and biomass

Overall, seven species of seagrass were sampled during this study: *Zostera japonica* Ascherson and Graebner, *Halodule pinifolia* (Miki) den Hartog, *H. uninervis* (Forsskål) Ascherson, *Cymodocea rotundata*, *C. serrulata*, *Thalassia hemprichii* and *Halophila ovalis* (R. Brown) Hooker f. Species compositions were the same at Nagahama and Takahama (4 species,Table 1), but different at Ibaruma (3 species) or Urasoko (5 species). *C. rotundata* and *T. hemprichii* occurred at all the four sites. *T. hemprichii* was the most dominant species in dry weights of the whole tissue and the three separated parts (leaf, "sheath+erect shoot", and horizontal rhizome) at all sites except Ibaruma where the leaf dry weight of *C. serrulata* was dominant. Dry weights of whole tissue and the three separated parts of *T. hemprichii* were significantly different between four sites (Kruskal-Wallis tests, $p<0.05$) Total dry weight of *T. hemprichii* at Takahama (16.96g per quadrat) was 2.5 times larger than at Ibaruma (6.79g). However for all the species combined, the total dry weights were not significantly different between the four sites (Kruskal-Wallis tests, $p>0.05$).

Shoot density and shoot morphology

Shoot and leaf density of the larger three species (*C. rotundata*, *C. serrulata* and *T. hemprichii*) varied between the four sites (Table 2). *C. serrulata* occurred only abundantly at Ibaruma. Differences in the leaf area, numbers of shoots and leaves of *T. hemprichii* and *C. rotundata* were statistically significant between the four sites (Kruskal-Wallis tests, $p<0.05$). For *T. hemprichii*, number of shoots and leaves at Takahama were 4.9 and 6.4 times higher than at Ibaruma,

Table 1. Mean (+SD) seagrass dry weight (g, 60℃ 24h) at four sites (per 25cm×25cm quadrat, n=4). Zj: *Zostera japonica*, Hp: *Halodule pinifolia*, Hu: *Halodule uninervis*, Cr: *Cymodocea rotundata*, Cs: *Cymodocea serrulata*, Th: *Thalassia hemprichii*, and Ho: *Halophila ovalis*.

	Leaf	Sheath+Erect shoot	Horizontal rhizome	Whole tissue
Ibaruma				
Cr	0.15+0.17	0.26+0.19	0.29+0.25	0.70+0.56
Cs	1.45+0.63	1.24+0.15	1.75+0.38	4.43+0.72
Th	0.51+0.27	4.23+2.33	2.05+0.85	6.79+3.25
Total	2.10+0.82	5.73+2.34	4.07+0.70	11.92+3.21
Urasoko				
Zj	0.41+0.13	0.57+0.22	0.39+0.17	1.36+0.45
Cr	0.09+0.07	0.38+0.42	0.11+0.06	0.57+0.59
Cs	0.03+0.06	0.02+0.04	0.15+0.21	0.16+0.32
Hu	0.06+0.03	0.12+0.05	0.19+0.10	0.36+0.15
Th	1.33+0.56	6.62+3.23	3.61+1.16	11.56+4.30
Total	1.91+0.64	7.70+3.44	4.44+1.17	14.04+4.49
Nagahama				
Hp	0.17+0.06	0.26+0.11	0.60+0.29	1.03+0.44
Cr	0.31+0.10	1.40+0.63	1.28+0.47	2.98+1.09
Th	0.85+0.27	5.76+1.30	2.59+0.29	9.20+1.29
Ho	0.05+0.01	0.03+0.01	0.06+0.04	0.14+0.06
Total	1.37+0.31	7.45+1.35	4.52+0.49	13.34+1.75
Takahama				
Hp	0.00+0.01	0.01+0.02	0.01+0.01	0.02+0.03
Cr	0.08+0.04	0.21+0.03	0.28+0.01	0.57+0.07
Th	1.20+0.06	9.96+2.08	5.81+1.60	16.96+2.81
Ho	0.01+0.01	0.01+0.01	0.01+0.01	0.01+0.03
Total	1.28+0.07	10.18+2.10	6.10+1.59	17.56+2.82
Results of Kruskal-Wallis test				
Cr	ns	*	***	*
Th	*	*	***	**
Total	ns	ns	ns	ns

ns:no significance, *:$p<0.05$, **:$p<0.01$ and ***:$p<0.005$

respectively. The difference in leaf area between Takahama and Ibaruma was 2.2 times, which is similar to the leaf dry weight (2.4 times). On the other hand, combined for the three species, total leaf area did not differ significantly between the four sites (Kruscal-Wallis tests, $p>0.05$).

Variations in the shoot morphology between the sites were also recognized (Table 3). Differences in the number of leaves per shoot, leaf width and the length of "sheath + erect shoot" of *T. hemprichii* and *C. rotundata* were statistically significant between the sites (Kruskal-Wallis tests, $p<0.005$). For *T. hemprichii*, shoots at Ibaruma and Urasoko could be characterized by their lower number of leaves, wider leaf width, and longer "sheath + erect shoot" length than at Nagahama and Takahama (Table 3). The maximum leaf length was also longer at Ibaruma and Urasoko than at Nagahama and Takahama. Similar variations in shoot morphology between the sites were observed in *C. rotundata*, except for the number of leaves per shoot (Table 3).

Leaf length structure and bite marks

Leaf length structure of *T. hemprichii* varied between the four sites (Fig. 3), which corresponded to the between-site variation in the

Table 2. Mean (+SD) number of shoots, number of leaves and leaf area at four sites (per 25cm×25cm quadrat, n=4). Cr: *Cymodocea rotundata*, Cs: *Cymodocea serrulata* and Th: *Thalassia hemprichii*.

	No. shoots	No. leaves	Leaf area (cm²)
Ibaruma			
Cr	7.8+ 6.9	21.5+19.6	57.5+ 53.4
Cs	19.0+ 4.7	57.8+12.6	448.4+147.8
Th	18.8+ 6.8	43.0+16.6	167.4+ 84.8
Urasoko			
Cr	3.8+ 3.3	9.3+ 8.1	29.6+ 29.0
Cs	0.5+ 1.0	1.3+ 2.5	10.0+ 20.0
Th	29.3+ 5.9	75.3+15.1	453.9+184.2
Nagahama			
Cr	53.8+22.3	139.0+53.8	138.1+ 41.4
Th	43.5+ 8.1	156.5+35.4	287.5+ 83.9
Takahama			
Cr	12.0+ 5.0	30.8+12.3	26.4+ 9.6
Th	93.0+15.0	273.3+35.8	361.7+ 26.8
Results of Kruskal-Wallis test			
Cr	***	***	*
Th	***	***	***

*: $p<0.05$ and ***: $p<0.005$

Table 3. Mean (+SD) number of leaves, leaf width and sheath length (per shoot, n = number of shoots) at four sites. Maximum leaf length at each station is also listed. Cr: *Cymodocea rotundata*, Cs: *Cymodocea serrulata* and Th: *Thalassia hemprichii*.

	n	No. leaves per shoot	Leaf width (mm)	Sheath+Erect shoot length (cm)	Max. leaf length (cm)
Ibaruma					
Cr	31	2.77+0.62	3.58+0.90	4.68+1.94	16.9
Cs	76	3.04+1.38	8.50+1.92	4.39+2.04	17.8
Th	75	2.29+0.93	5.64+1.56	9.12+3.17	16.5
Urasoko					
Cr	15	2.47+0.64	4.00+0.57	5.97+3.19	19.0
Cs	2	2.50	6.50	4.20	13.1
Th	117	2.57+0.77	6.75+1.93	9.47+4.23	19.1
Nagahama					
Cr	215	2.59+0.84	2.76+0.77	2.78+1.54	8.8
Th	174	3.60+1.10	5.23+1.39	6.05+2.83	9.1
Takahama					
Cr	48	2.56+0.68	2.92+0.65	2.24+1.07	8.6
Th	372	2.94+0.74	4.51+1.67	3.98+1.37	7.7
Results of Kruskal-Wallis test					
Cr		***	***	***	
Th		***	***	***	

***: $p<0.005$

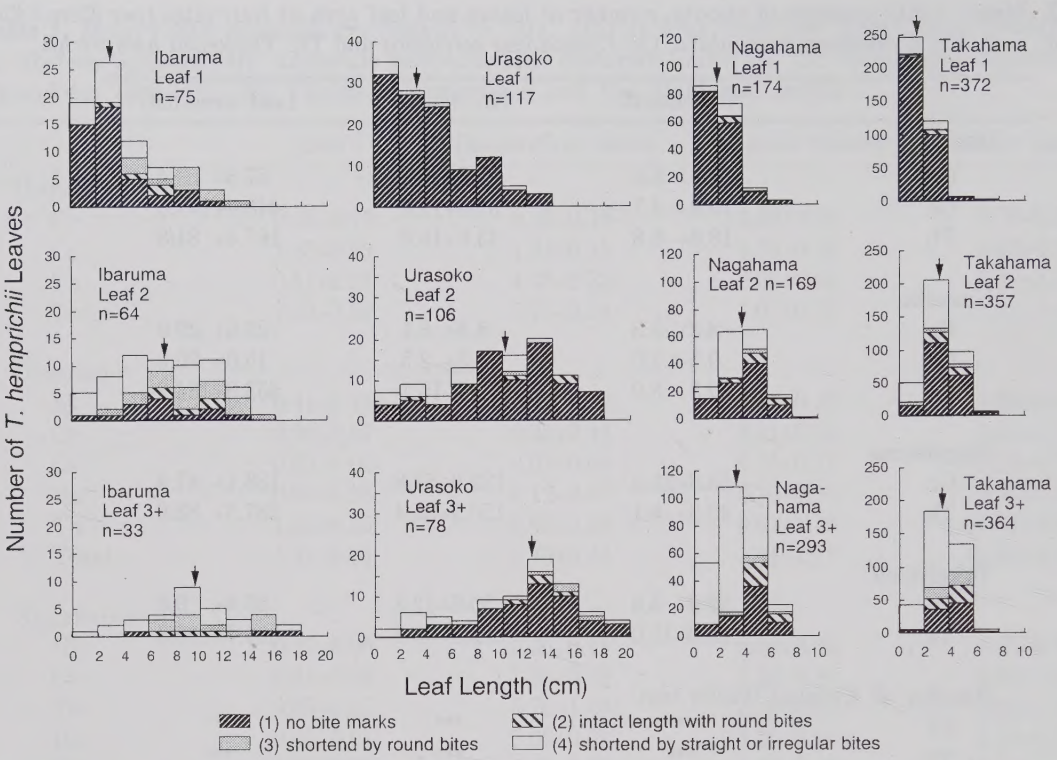

Ibaruma Leaf 1 n=75
Urasoko Leaf 1 n=117
Nagahama Leaf 1 n=174
Takahama Leaf 1 n=372
Ibaruma Leaf 2 n=64
Urasoko Leaf 2 n=106
Nagahama Leaf 2 n=169
Takahama Leaf 2 n=357
Ibaruma Leaf 3+ n=33
Urasoko Leaf 3+ n=78
Naga- hama Leaf 3+ n=293
Takahama Leaf 3+ n=364
Number of T. hemprichii Leaves
Leaf Length (cm)
(1) no bite marks
(2) intact length with round bites
(3) shortend by round bites
(4) shortend by straight or irregular bites

Fig. 3. Leaf length frequency histograms of *Thalassia hemprichii* at four sites. Leaves are classified by the order in the shoot and the type of their bite marks (see Fig. 2). The arrows indicate the median leaf length in each histogram. n = number of leaves.

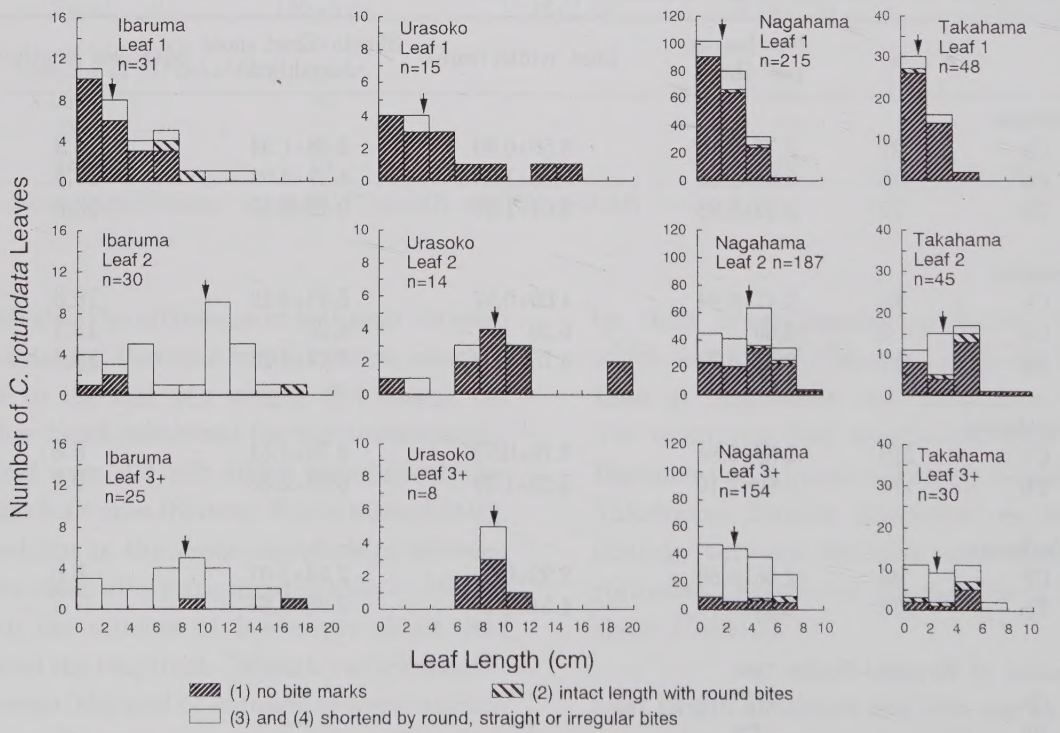

Ibaruma Leaf 1 n=31
Urasoko Leaf 1 n=15
Nagahama Leaf 1 n=215
Takahama Leaf 1 n=48
Ibaruma Leaf 2 n=30
Urasoko Leaf 2 n=14
Nagahama Leaf 2 n=187
Takahama Leaf 2 n=45
Ibaruma Leaf 3+ n=25
Urasoko Leaf 3+ n=8
Nagahama Leaf 3+ n=154
Takahama Leaf 3+ n=30
Number of C. rotundata Leaves
Leaf Length (cm)
(1) no bite marks
(2) intact length with round bites
(3) and (4) shortend by round, straight or irregular bites

Fig. 4. Leaf length frequency histograms of *Cymodocea rotundata* at four sites. Leaves are classified by the order in the shoot and the type of their bite marks (see Fig. 2). The arrows indicate the median leaf length in each histogram. n = number of leaves.

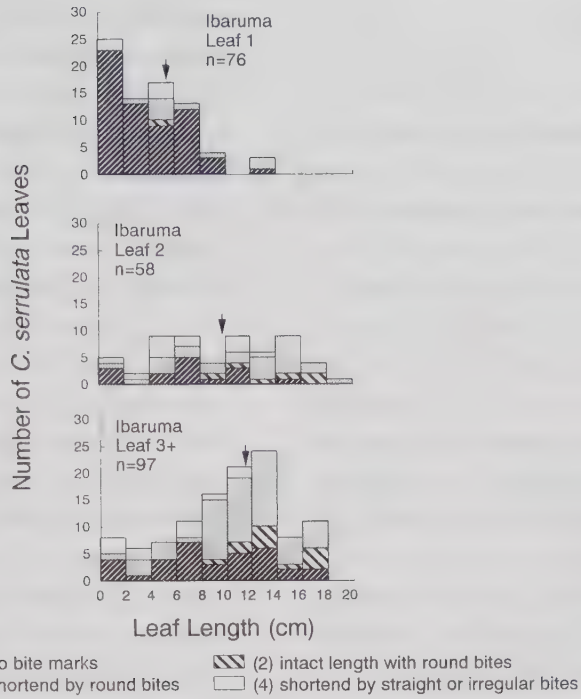


Fig. 5. Leaf length frequency histograms of *Cymodocea serrulata* at Ibaruma. Leaves are classified by the order in the shoot and the type of their bite marks (see Fig. 2). The arrows indicate the median leaf length in each histogram. n = number of leaves.

maximum leaf length (Table 3). Generally, the youngest leaves (Leaf 1) were shorter than the older leaves (Leaf 2 and Leaf 3+). Leaves at Nagahama and Takahama were shorter than those at Ibaruma and Urasoko. Statistically significant differences in the median leaf length were detected between the leaf orders and the sites (Kruskal-Wallis tests, $p<0.0001$). *C. rotundata* showed similar variations both in the leaf order and the sites (Fig. 4) and also in the leaf order of *C. serrulata* at Ibaruma (Fig. 5), where this species was abundant.

A large proportion of *T. hemprichii* leaves had bite marks (Fig. 3). The proportion of leaves with bite marks (number of leaf types 2, 3 and 4 against all the leaves) varied between the sites: the minimum of 17.6% at Urasoko (n =301), 45.6% at Takahama (n=1093), 50.9% at Nagahama (n=636), and the maximum of 65.1% at Ibaruma (n=172). Within the three types of bitten leaves, the proportion of type 4 (shortened leaf by straight or irregular bites) was the largest at all the sites. The proportion of type 3 (shortened leaf by round bites) was larger at Ibaruma than the other sites. In addition, the proportion of leaves with bite marks increased with the leaf age: for example at Ibaruma, 41.3% for Leaf 1, 79.7% for Leaf 2 and 90.9% for Leaf 3+. Similar frequency patterns of bitten leaves were observed in *C. rotundata* (Fig. 4) and *C. serrulata* (Fig. 5): the proportion of leaves with bite marks increased with leaf age and was largest at Ibaruma. Comparison between the three species at Ibaruma showed that the frequency of bitten leaves was largest for *C. rotundata* (68.6%, n=86) followed by *T. hemprichii* (65.1%, n=172) and *C. serrulata* (58.9%, n=231), although the difference in the frequency of bites was not statistically significant (Goodness-of-fit test, $p>0.05$).

Discussion

Previous surveys of seagrasses reported nine species around the Yaeyama Islands (Tsuda and Kamura, 1990) instead of seven species in this study. The two remaining species are *Enhalus acoroides* (Linnaeus f.) Royle, which has a patchy distribution and is found only in several bays (Nozawa, 1972), and *Syringodium isoetifolium*

(Ascherson) Dandy, which occurs in more wave-exposed areas (Kanamoto and Watanabe, 1981) than the areas of this study. Habitats of *Zostera japonica* are sometimes influenced by brackish water (Lee, 1997). Also in this study, *Z. japonica* occurred only at Urasoko Bay, where fresh water flowed from small brackish creeks and paddy fields behind the shoreline after heavy rain (Takada, personal observations).

Results of this study demonstrated that local variations in seagrass species composition, shoot density, shoot morphology and proportion of leaves with bite marks were considerable in the Yaeyama Islands within the same water depth in lagoons. According to the shoot density and the shoot morphology of *Thalassia hemprichii*, the four sites can be divided into two groups: (1) Ibaruma and Urasoko, and (2) Nagahama and Takahama. At Ibaruma and Urasoko, the shoot density was lower, and each shoot had a lower number of leaves, wider and longer leaves, and a longer "sheath+erect shoot" length than at Nagahama and Takahama. This grouping corresponds to the topographic characteristics of the shores. Ibaruma and Urasoko are north-facing and wave-protected shores, while Nagahama and Takahama are south-facing and wave-exposed shores. Interestingly, the pattern of site variation in the shoot morphology was almost identical between *T. hemprichii* and *Cymodocea rotundata*. Interspecific variations in shoot morphologies within a site appeared smaller than intraspecific variations between the sites. This suggests that some site-specific factors lead to phenotypic convergence in shoot morphology between these seagrasses.

On the other hand, the total dry weight (all species combined) and the total leaf area of the larger three species (*C. rotundata*, *C. serrulata* and *T. hemprichii* combined) did not show any variations between the sites. One of the reasons for these insignificant between-site variations in total dry weight and leaf area is that the within-site variations are larger than the between-site variations. For example, leaf areas at Urasoko ranged from 43.6% to 114.0% against the area sampled ($625cm^2$), while the mean values of the four sites ranged from 62.1% to 107.7%. Another reason is that the longer leaf length at Ibaruma and Urasoko may compensate for the lower shoot density and the fewer number of leaves per shoot. These compensated variations in shoot morphology decreased the between-site variations.

In comparison with mixed species seagrass beds in the Philippines (Tomasko *et al.*, 1993; Vermaart *et al.*, 1995; Bach *et al.*, 1998; Terrados *et al.*, 1998), the shoot density of *T. hemprichii* at Nagahama and Takahama were higher than in the Philippines. The leaf width of *T. hemprichii* and *C. rotundata* were narrower, and the leaf length of *C. rotundata* was shorter in the Yaeyama Islands than in the Philippines. But the leaf length of *C. serrulata* and *T. hemprichii* in the Philippines were similar at Nagahama and Takahama, which were shorter than at Ibaruma and Urasoko. According to these data, the shoot density and structure in Yaeyama Islands were more variable than in the Philippines. However, detailed comparison is difficult because of the wider range of scale in the above studies (1km-1000km) than in this study (10km-100km).

The results showed that the proportion of bite-marks on the seagrass leaves varied locally. At Ibaruma, 41.3-90.9% of leaves of *T. hemprichii* had bite marks, while 17.6% (pooled) at Urasoko. Although we did not estimate the ratio of consumption by herbivores against leaf production, the proportion of leaves with bite marks indicated that herbivory on the seagrass leaves was not negligible (for example, Valentine and Heck, 1999) and that the intensity of herbivory were also variable within a local scale. Zieman *et al.* (1984) noted that a reduction in the width of leaves indicated stress by heavy herbivory. The width of leaves at Urasoko being broadest may correspond to the least herbivory between the four sites.

A full discussions encompassing all the possible factors for these local variations are out of the scope of this paper. But, preliminary observations on the stomach contents of green

turtles (*Chelonia mydas*) suggest that the green turtles significantly consume seagrasses and contribute to the local variation in herbivory on seagrasses. Green turtles are known to forage repeatedly on seagrasses within a small (<6km^2) area (Mendonça, 1983; Brill *et al.*, 1995). Presence (or absence) of green turtles may produce the observed local variation in the intensity of herbivory between the seagrass beds in this study area.

The proportion of leaves with bite marks did not correspond to the local variation of the leaf length structure. Although seagrasses at Ibaruma and Urasoko showed similar leaf length structures, the proportion of leaves with bite marks were the highest at Ibaruma and the lowest at Urasoko between the four sites. There is a possibility that the growth of these seagrass leaves is enhanced by herbivory (Thayer *et al.*, 1984) and the modification of leaf length structure is compensated for this. Experimental evidence is required to evaluate whether exact or over/under compensation would occur (Cebrián *et al.*, 1998). Thus, the present results show that the effects of herbivory on the leaf length structure are unclear in this study area.

In conclusion, this study demonstrated considerable variations of density, shoot morphology and levels of herbivory between seagrass beds within a local scale (10km-100km). The pattern of the local variations were almost identical between *Thalassia hemprichii* and *Cymodocea rotundata*, but the total biomass did not vary between sites. Effects of herbivory on the leaf length structure were unclear. Relation between the seagrass shoot morphology and the balance of production and consumption require further clarification.

Acknowledements

We would like to thank Z. Kanamoto and T. Shibuno for reviewing this manuscript. We would also like to thank K. Hashimoto and M. Kobayashi for assistance in the field and the laboratory.

References

Bach S. S., Borum J., Fortes M. D., and Duarte C. M., 1998: Species composition and plant performance of mixed seagrass beds along a siltation gradient at Cape Bolinao, The Philippines. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **174**, 247-256.

Brill R. W., Balazs G. H., Holland K. N., Chang R. K. C., Sullivan S., and George J. C., 1995: Daily movements, habitat use, and submergence interval of normal and tumor-bearing juvenile green turtles (*Chelonia mydas* L.) within a foraging area in the Hawaiian islands. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **185**, 203-218.

Brouns J. J. W. M., 1987: Quantitative and dynamic aspects of a mixed seagrass meadow in Papua New Guinea. *Aquat. Bot.*, **29**, 33-47.

Cebrián J., Duarte C. M., Agawin N. S. R., and Merino, M., 1998: Leaf growth response to simulated herbivory: a comparison among seagrass species. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **220**, 67-81.

de Iongh H. H., Wenno B. J., and Meelis E., 1995: Seagrass distribution and seasonal biomass changes in relation to dugong grazing in the Moluccas, East Indonesia. *Aquat. Bot.*, **50**, 1-19.

Edgar G. J., Shaw C., Watson G. F., and Hammond L. S., 1994: Comparisons of species richness, size-structure and production of benthos in vegetated and unvegetated habitats in Western Port, Victoria. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **176**, 201-226.

Horinouchi M. and Sano M., 1999: Effects of changes in seagrass shoot density and leaf height on abundances and distribution patterns of juveniles of three gobiid fishes in a *Zostera marina* bed. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **183**, 87-94.

Horinouchi M., Sano M., Taniuchi T., and Shimizu M., 1999: Effects of changes in leaf height and shoot density on the abundance of two fishes, *Rudarius ercodes* and *Acentrogobius pflaumii*, in a *Zostera* bed. *Icthyol. Res.*, **46**,

49-56.

Kanamoto Z. and Watanabe T., 1981: Ecological study of the seagrass meadows in Nagura Bay, Ishigaki Island, Okinawa, I, Ecological distribution of seagrass. *Benthos Res.,* **21/22**, 1-14. (in Japanese with English abstract)

Lee S. Y., 1997: Annual cycle of biomass of a threatened population of the intertidal seagrass *Zostera japonica* in Hong Kong. *Mar. Biol.,* **129**, 183-193.

McClanahan T. R., Nugues M., and Mwachireya S., 1994: Fish and sea urchin herbivory and competition in Kenyan coral reef lagoons: the role of reef management. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.,* **184**, 237-254.

Mendonça M. T., 1983: Movements and feeding ecology of immature green turtles (*Chelonia mydas*) in a Florida lagoon. *Copeia,* **1983**, 1013-1023.

Mukai H., 1993: Biogeography of the tropical seagrasses in the Western Pacific. *Austr. J. Mar. Freshw. Res.,* **44**, 1-17.

Nozawa Y., 1972: On the sea-grass from Ishigaki Island. *Bull. Kagoshima Junshin Women's College,* **2**, 56-66.

Orth R. J., Heck Jr. K. L., and van Montfrans J., 1984: Faunal communities in seagrass beds: a review of the influence of plant structure and prey characteristics on predator-prey relationships. *Estuaries,* **7**, 339-350.

Poiner I. R., Walker D. I., and Coles R. G., 1989: Regional studies - Seagrasses of tropical Australia. in "Biology of seagrasses, a treatise on the biology of seagrasses with special reference to the Australian region" (eds. by Larkum A. W. D., McComb A. J., and Shepherd S. A.), Elsevier, Amsterdam, pp. 279-303.

Terrados J., Duarte C. M., Fortes M. D., Borum J., Agawin N. S. R., Bach S., Thampanya U., Kamp-Nielsen L., Kenworthy W. J., Geertz-Hansen O., and Vermaat J., 1998: Changes in community structure and biomass of seagrass communities along gradients of siltation in SE Asia. *Estuar. Coast. Shelf Sci.,* **46**, 757-768.

Thayer G. W., Bjorndal K. A., Ogden J. C., Williams S. L., and Zieman J. C., 1984: Role of larger herbivores in seagrass communities. *Estuaries,* **7**, 351-376.

Tomasko D. A., Dawes C. J., Fortes M. D., Largo D. B., and Alava M. N. R., 1993: Observations on a multi-species seagrass meadow offshore of Negros Oriental, Republic of the Philippines. *Bot. Mar.,* **36**, 303-311.

Trautman D. A. and Borowitzka M. A., 1999: Distribution of the epiphytic organisms on *Posidonia australis* and *P. sinuosa,* two seagrasses with differing leaf morphology. *Mar. Ecol. Prog. Ser.,* **179**, 215-229.

Tsuda R. T. and Kamura S., 1990: Comparative review on the floristics, phytogeography, seasonal aspects and assemblage patterns of the seagrass flora in Micronesia and the Ryukyu Island. *Galaxea,* **9**, 77-93.

Valentine J. F. and Heck Jr. K. J., 1999: Seagrass herbivory: evidence for the continued grazing of marine grasses. *Mar. Ecol. Prog. Ser.,* **176**, 291-302.

Vermaat J. E., Agawin N. S. R., Duarte C. M., Fortes M. D., Marba N., and Uri J. S., 1995: Meadow maintenance, growth and productivity of a mixed Philippine seagrass bed. *Mar. Ecol. Prog. Ser.,* **124**, 215-225.

Zieman J. C., Iverson R. L., and Ogden J. C., 1984: Herbivory effects on *Thalassia testudinum* leaf growth and nitrogen content. *Mar. Ecol. Prog. Ser.,* **15**, 151-158.

水研センター研報，第4号，11－18，平成14年
Bull. Fish. Res. Agen. No. 4, 11-18, 2002

Effects of body size and temperature on the relationship between growth and ration of young Japanese flounder, based on laboratory experiments

Masaaki FUKUDA[*1], Hiroshi SAKO[*2], Toshihiro SHIGETA[*3], and Rena SHIBATA[*3]

Abstract To derive an empirical equation for the relationship between growth and ration of young Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, the effects of fish size and temperature were studied. Juvenile flounder were reared at six ration levels using squid as food in the laboratory for 14 days. Feeding experiments were conducted for six different fish sizes (7.5-337g) at 20℃ and for 70g size at two more temperature conditions (15℃ and 26 ℃). Significant positive linear relationships were found between growth (g/day) and daily ration (kcal/day) for all size groups and for all temperature conditions. The net conversion efficiencies (b) and the maintenance rations (c) at 20℃ could be expressed as a power function of body weight (W) as follows: $b=0.678W^{-0.095}$ and $c=0.023W^{0.746}$. The maintenance rations (c) were correlated with the three temperatures, and the relationship was expressed as $c=0.153e^{0.054T}$. The relationship between growth rate and daily ration at any size and at any temperature is described by the following equation:

$R=0.007(e^{0.054T})W^{0.75}+1.47W^{0.10}G$ kcal/day,

where R=daily ration (kcal/day), T=temperature (℃), W=body weight (g) and G=growth (g/day).

Key words: *Paralichthys olivaceus*, energy model, food requirement, growth rate

The Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, is an important commercial fish in Japan and a famous traditional fisheries resource in the Seto Inland Sea. Stocking of Japanese flounder in the Seto Inland Sea has been carried out since the late 1970's and the number of released fish has increased rapidly in recent years. Success of the stock enhancement by releasing fish depends strongly on survival rate from releasing to recruitment of the wild population. The major cause of mortality in released Japanese flounder is believed to be predation in the nursery grounds, and faster growing individuals have been found to have a higher survival rate (Yamashita *et al.*, 1994). These finding suggested that one of the important factors for the effective stocking enhancement was to determine of an appropriate releasing number corresponding to food abundance in a releasing area. As the first step to know the appropriate number of releasing fish into the releasing area, food requirement of young Japanese flounder should be known. Jones and Hislop (1978) and Jones (1978) examined the relationships between growth and food intake in gadoids (*Melanogrammus aeglefinus, Merlangius merlangus, Godus morhua,* and *Pollachius virens*) to estimate the food requirement using empirical equations derived

2002年1月24日受理（Received on January 24, 2002）
水産総合研究センター業績 A 第18号（Contribution No. A 18 from the Fisheries Research Agency）
*1 中央水産研究所海区水産業研究部 〒238-0316 横須賀市長井6-31-1（Coastal Fisheries and Aquaculture Division, National Research Institute of Fisheries Science, Nagai 6-31-1, Yokosuka, Kanagawa 238-0316, Japan）
*2 中央水産研究所 〒236-8648 横浜市金沢区福浦2-12-4（Research Promotion and Development Division, Fisheries Research Agency, Fukuura, Kanazawa, Yokohama, 236-8648, Japan）
*3 瀬戸内海区水産研究所 〒739-0452 広島県佐伯郡大野町2-17-5（National Research Institute of Fisheries and Environment of Inland Sea, Ohono-cho 2-17-5, Saeki-gun, Hiroshima 739-0452, Japan）

from laboratory experiments.

As we need to estimate how much food is required by juvenile flounder in the nursery ground, such empirical equations as reported by Jones and Hislop (1978) are valid tools. To derive the empirical equation, following data were needed: 1) the effects of fish size on the growth-ration relationship, 2) the effects of temperature on the growth-ration relationship. Therefore, the present study was undertaken to determine the effects of size and temperature on the growth-ration relationship and to derive an empirical equation for the estimation of the food requirement of young Japanese flounder in the Seto Inland Sea.

Materials and Methods

Japanese flounder were obtained from a hatchery at Atadajima, Hiroshima prefecture, in the Seto Inland Sea, Japan in 1995. The fish were kept at an ambient temperature in large rectangular tanks with flowing filtered seawater and fed on artificial food once a day until the start of the experiments.

To examine the effects of size differences on growth-ration relationships, feeding experiments were carried out for six size groups (mean initial weight±SD, 7.48±1.3g, 16.1±1.9 g, 33.3±2.2g, 69.7±5.5g, 155±11g, 337±34g) at 20℃ (mean±SD, 20.0±0.2℃). And to examine the temperature effects on growth-ration relationships, similar feeding experiments were conducted under two more temperature condition at 15℃ (mean±SD, 15.0±0.1℃) and 26℃ (mean±SD, 26.0±0.2℃) for 70g size groups, 68.4±9.1g and 69.2±5.2g, respectively. In all experiments, six ration levels (0.0, 0.5, 2.0, 4.0, 6.0 and 8.0% body weight per day) were established. The numbers of fish used at one of the six ration levels were five individuals, and then thirty fish were used at an experiment. Squid fillets were used as food.

Before the experiments, thirty fish were transferred from the reservoir tank to experimental tanks and fed on squid fillets until satiation during 10days. Each tank was divided vertically by plastic mesh partitions into several compartments where fish were placed individually. Tanks and compartment sizes were changed depending on fish size (Table 1).

The bottom of each tank was covered by a 5cm layer of sand through a 1mm mesh. The water was circulated continually through an external reservoir and filter bed and the flow rate was controlled at 8 changes per day. The water temperature was controlled in a reservoir tank using a heating-cooling unit.

At the start of the experiment, the fish were weighed while they were anesthetized with 3-aminobenzonic acid ethyl ester methanesulfonate salt (SIGMA Co. Ltd.) solution (80ppm). Fish were then placed in the compartments individually and were fed squid fillets at one of six ration levels. The squid mantles were cut into small fillets and weighed before they were fed to fish. Fish were given squid fillets once a day in the morning. Food that was not consumed

Table 1. The size of the aquaria and compartments used for the feeding experiments of young Japanese flounder

Fish size (g)	Aquaria* (size×number)	Size of compartment (width×length×depth,cm)
7.48	S×2	17×13×50
16.1	L×1	24×16×90
33.3	S×1	27×20×50
	L×1	27×20×90
69.8	L×2	31×28×90
155	L×3	40×28×90
337	L×3	40×40×90

*:Size of aquaria , S=90cm×60cm×50cm, L=180cm×90cm×90cm.

was removed from the tank in the late afternoon and weighed. The amount of food at each ration was determined at the start of the experiment based on the mean weight of all fish. Each feeding experiment lasted 14 days. At the end of each experiment, the fish were anesthetized as described above and weighed.

Daily specific growth rate was estimated by the following equation:

$$g_i=(\ln W_t-\ln W_0)/t,$$

$$G_s=(e^{g_i}-1)\times 100,$$

where g_i=instantaneous growth rate, G_s=daily specific growth rate (% body weight), W_t=body weight at the end of the experiment, W_0=body weight at the beginning of experiment, and t=duration of the experiment (always 14 days). Since the ration need to be measured accurately, actual ration was also calculated from the mean daily food intake divided by weight at the half-way point of the experiments (day 8) using the following equation:

$$R_A=F_T/t\ /[W_0e^{(g_i\times tm)}]\times 100,$$

where R_A is the actual ration in percent body weight per day, F_T is the total food intake during the duration of the experiments, t is the duration of the experiment (14 days for here), W_0 is the body weight at the beginning of the experiments, g_i is the instantaneous growth rate and t_m is the mid-point of the duration of the experiments (day 8 here). Growth rate in g/day (G_g) and ration in kcal/day (R_{kcal}) were calculated as follows;

$$G_g = (W_t-W_0)/t,$$

$$R_{kcal} = F_T/t\times C_v$$

where W_t=body weight at the end of the experiment, W_0=body weight at the beginning of experiment, and t=duration of the experiment (always 14 days), F_T is the total food intake during the duration of the experiments, C_v was a mean caloric value of squid fillets. The caloric contents of the squid fillets used for food were measured with a bomb-caloric meter (Shimadzu CA-4P; Shimadzu Co. Ltd.), and the calculated mean was 1.16±0.1 kcal/g wet weight (mean ±SD, n=3).

Results

Effects of size differences Positive linear relationships between daily specific growth rates (%/day) and daily actual ration (%/day) were found in all size groups (Fig. 1).

Weight losses occurred in all fish reared at lower ration levels. The actual ration at which the fish attained maximum growth tended to decrease with increasing of fish size. Highest growth rate of 4.25%/day was obtained in 7.5g size and lowest one was 2.15%/day in 337g size. In order to standardize the measurement of ration (%/day) in terms of a common energy unit, regression analysis between the growth in g/day (G_g) and the ration in kcal/day (R_{kcal}) were carried out in accordance with Jones and Hislop (1978). Table 2 shows the results of least-squares regressions for G_g against R_{kcal} from the feeding experiments. In all cases, the relationship between daily growth in g/day and daily ration in kcal/day was fitted a linear model significantly and the equation is described as follows:

$$G_g = a + b\ R_{kcal}\ . \qquad (1)$$

If growth is zero, the equation is rewritten as follows:

$$R_{kcal} = -a/b, \qquad (2)$$

The right side (-a/b) of the equation (2) corresponds to the point where the regression line cross the food axis. If -a/b=c, the c is equivalent to daily maintenance requirements of food.

Equation (1) may also be written in terms of b and c (=-a/b) in the forms:

$$G_g = b(R_{kcal} -c), \qquad (3)$$

and then,

$$b = G_g /(R_{kcal} -c), \qquad (4)$$

ie., b=growth/(total food-food for maintenance). Therefore the slop of regression (b) provide estimates of net efficiencies of conversion of food into growth.

Constants (a) of the regression analyses shown in Table 2 represent the rates of weight losses when the fish were not fed; values ranged from -0.053 to -0.896 (g/day). The slope values (b) in Table 2, which correspond to the net conversion efficiency, tended to be higher for smaller fish than for larger ones; values ranged from 0.536 to 0.376 (g/kcal). Since the relationship between net conversion efficiency and body

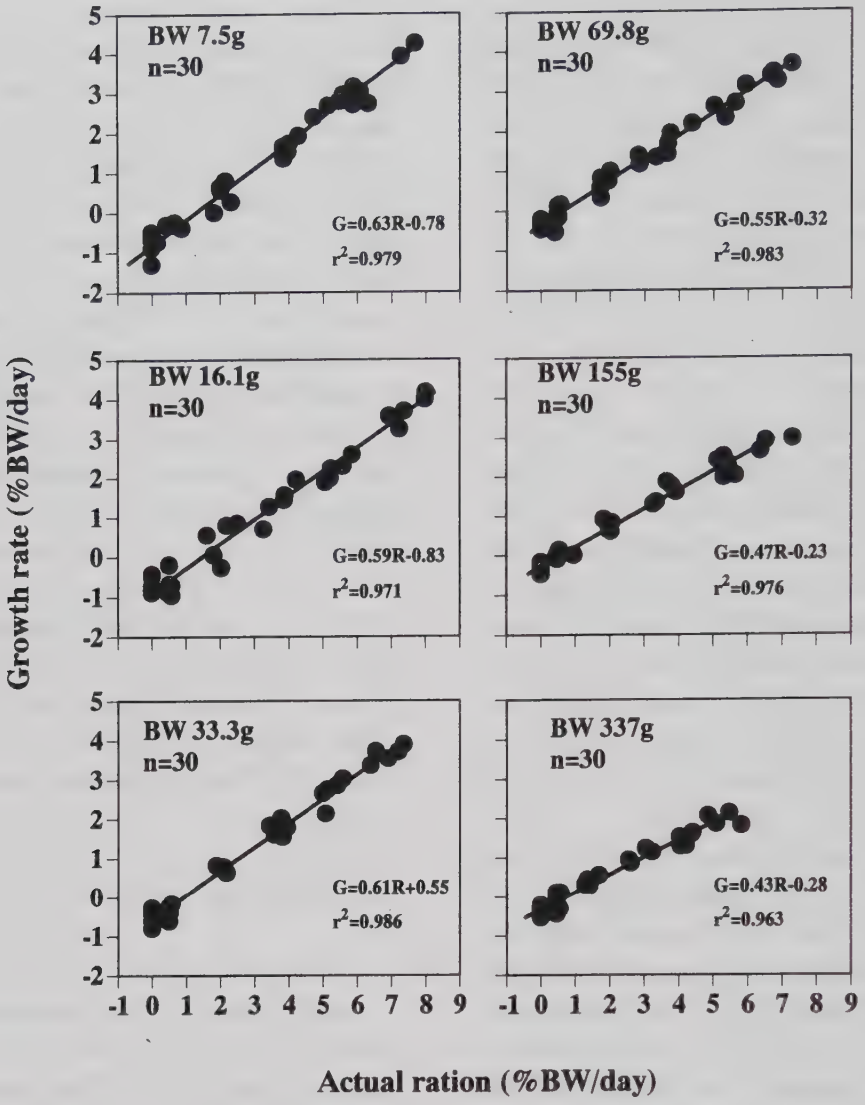


Fig. 1. Relationships between growth rates (G:%/day) and food consumption (R:%/day) for different sizes of Japanese flounder fed on squid fillets at 20℃. BW=body weight, n=number of fish.

Table 2. Slops and intercepts of regressions of growth on food consumption calculated from regression equationsof the form $G_g = a + bR_{kcal}$, where G_g =growth(g/day) and R_{kcal}=food consumption(Kcal/day)

Size (g)	N	Constant*1 (a)	Slope*2 (b)	Intercept on food axis*3 (c)	Correction coefficient	p
7.48	30	-0.053	0.536	0.099	0.992	p<0.0001
16.1	30	-0.126	0.507	0.249	0.986	p<0.0001
33.3	30	-0.167	0.527	0.317	0.994	p<0.0001
69.7	30	-0.207	0.477	0.434	0.982	p<0.0001
155	30	-0.327	0.411	0.796	0.989	p<0.0001
337	30	-0.896	0.376	2.383	0.982	p<0.0001

*1:(a) represets the rate of weight loss when the fish is not fed.
*2:(b) is equivalent to the net efficiency of conversion of food into growth.
*3:(c) is equivalent to the food required to maintain a fish with zero growth rate.

weight can be expressed as a power function (Jones and Hislop, 1978), the values of b in Table 2 were plotted against mean initial body weight (Fig. 2-A). Both variates were plotted on logarithmic scales. The coefficient (b) tended to decrease with increasing body weight, and is described in the following equation:

$b=0.678W^{-0.095}$ (g/kcal) ($r^2=0.869$),

where b=net conversion efficiency, W=body weight.

Maintenance rations were shown in Table 2 as the intercept on the daily ration axis (c). These rations increased with size, ranging from 0.099 kcal/day for fish of 7.48g to 2.38kcal/day for fish of 337g. Since the maintenance ration is a power function of body weight (Jones and Hislop, 1978), the maintenance rations (c) were plotted against mean initial body weight on a logarithmic scale (Fig. 2-B). The resulting equation is given as follows:

$c=0.023W^{0.746}$ (kcal/day) ($r^2=0.952$),

where c=the maintenance ration, and W=body weight.

Effects of temperature Since maintenance rations increase with increasing temperature in various fish species, two feeding experiments at different temperatures (26℃ and 15℃) were conducted with fish weighing approximately 70g. Growth rates (g/day) were linearly related to ration levels (kcal/day) for fish reared at 15 and 26℃. Results of the regression analysis are shown in Table 3 together with the results of the experiment at 20℃ for the same 70g sized fish group. Maintenance rations, determined from the intercept of the daily ration axis (c), ranged from 0.349kcal/day to 0.626 kcal/day and increased with increasing temperature. The c value, which was converted into a natural logarithm, was linearly related to temperature (Fig. 3). The following equation describes the maintenance ration (c: kcal/day) as a function of water temperature (T=℃):

$c=0.153e^{0.054T}$ ($r^2=0.992$).

General equation for growth and ration According to Jones and Hislop (1978), the relationship between growth and ration at a constant temperature can be expressed as the following empirical equation:

$R=c+G/b$ (5),

where R=daily ration (kcal/day), G=growth (g/day), c=maintenance energy (kcal/day) and b=net conversion efficiency. Since c and b are both functions of body weight, they must be described as functional forms of body weight. Considering the previously calculated functional forms for maintenance energy (c) and conversion efficiency (b), equation (5) can be rewritten as follows:

$R=0.023W^{0.75}+G/0.68W^{-0.10}$ (6),

where W=body weight.

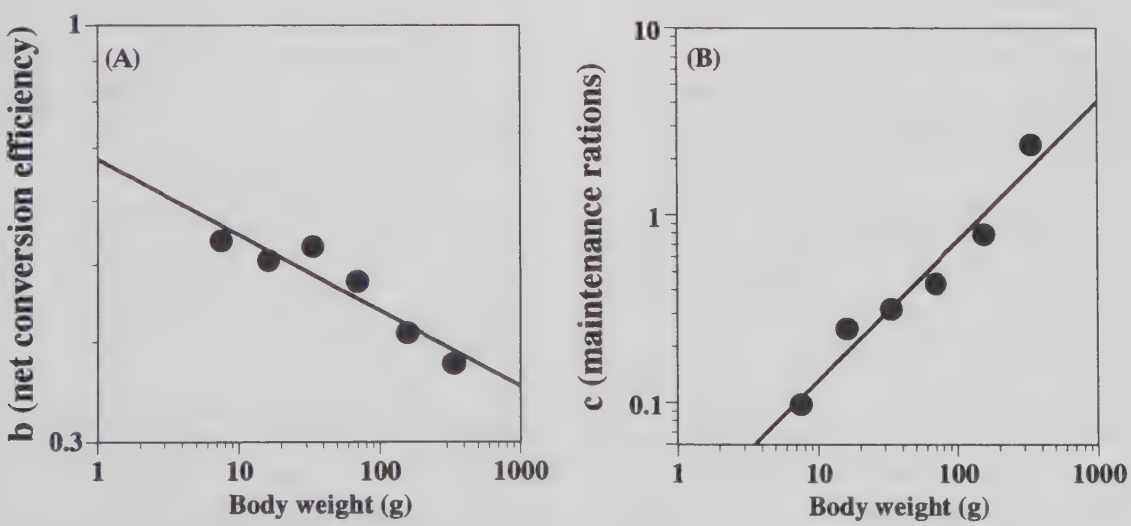


Fig. 2. Relationships between (A) the net conversion efficiency and (B) the maintenance rations, and body weight at 20℃.

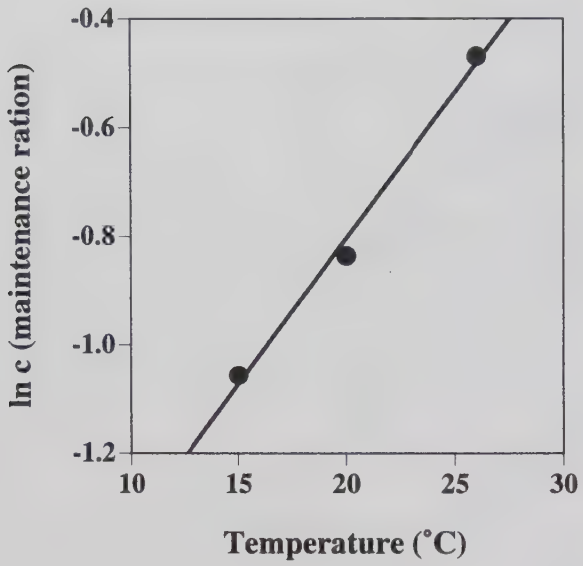


Fig. 3. Relationships between the maintenance rations and the water temperature

Maintenance energy (c) was found to be a function of temperature, with c expressed as an exponential model ($c=0.153e^{0.054T}$). Since most experiments were conducted at 20℃ in this study, temperature correction terms were based on measurements at 20℃. To convert to any temperature T℃, the temperature correction term of the maintenance energy could be written as:

$0.023\ [e^{0.054(T-20)}]W^{0.75}$.

The general equation derived from equation (6) with the temperature correction terms is:

$R=0.023[e^{0.054(T-20)}]W^{0.75}+G/(0.68W^{-0.10})$.

Therefore,

$R=0.007(e^{0.054T})W^{0.75}+1.47W^{0.10}G$ kcal/day, (7)

where R=daily ration (kcal/day), T=temperature (℃), W=body weight (g) and G=growth (g/day).

Discussion

The growth rates at 20℃ obtained at maximum actual ration of Japanese flounder in this study ranged between 2.2 to 4.3 percent body weight per day. Iwata et al. (1994) reported that the daily growth rates of similar size fish groups (4g-176g: four size groups) at 20℃ of Japanese flounder fed on commercial pellets until satiation were from 1.4 to 5.4 percent per day. Koshiishi and Yasunaga (1980) also obtained the growth rates of Japanese flounder ranging from 1.6% to 4.2% in 8.8g to 88.2g body size groups. These values reported previously were very similar to our results.

In order to test a general equation derived in this study for its validity, we calculated total calories using the equation with the data reported by Iwata et al. (1994) at 20℃ (Table 4). Initial body weights and terminal body weights were described for 20 days feeding experiments with four size groups (4g, 16g, 88g and 176g). The growth rates were recalculated using the equations in this study. Total food consumed by fish for 20 days were calculated from the values reading on the figure of Iwata's paper and using the equation for the daily feeding rate in that study. The caloric values of the total food consumed by the fish in that study were calculated from the data on a catalog of the commercial pellet producing company (Higashimaru Foods inc.). The caloric value of commercial pellets is 3.4kcal/g. Estimated total calories using our general equation calculated as follows:

Table 3. Slopes and intercepts of growth on food consumption calculated from regression equalations determined from three different temperature experiments

Water temperature(℃)	Size (g)	N	Constant*1 (a)	Slope*2 (b)	Intercept on food axis*3 (c)	Correction coefficient	p
26	69.2	30	-0.264	0.422	0.626	0.992	p<0.0001
20	69.7	30	-0.207	0.477	0.434	0.992	p<0.0001
15	68.4	30	-0.182	0.522	0.349	0.980	p<0.0001

*1:(a) represets the rate of weight loss when the fish is not fed.
*2:(b) is equivalent to the net efficiency of conversion of food into growth.
*3:(c) is equivalent to the food required to maintain a fish with zero growth rate.

Table 4. Testing of the general equation derived in this study for its validity using data reported by Iwata *et al.*(1994)

Size (g)	Initial body weight*1 (g)	Terminal body weight*1 (g)	Growth rates*2 (%/day)	Growth rates*2 (g/day)	Daily feeding rates*3 (%)	Total food consumed*4 (g)	Caluculated caiories*5 (kcal)	Estimated calories using the equation in this study (kcal)
16	17.3	39.3	4.2	1.1	2.6	14.7	50.0	49.5
88	88.5	119.7	1.5	1.6	1.1	22.9	77.9	86.1
176	182	239	1.4	2.9	1.0	46.3	157.4	165.4

*1:Initial and final weight were cited from Iwata *et al.* (1994). Original data were mean of 10 to 20 individuals.
*2:Growth rates were recalculated using equations in this study
*3:Daily feeding rate was reading value from the Fig. 2 of the Iwata *et al.* (1994)
*4:Total food in each size group was calculated from the the following equation described in the text of Iwata *et al.* (1994)
Total food consumed=Daily feeding rate$\times t\times(w_t+w_0)/2\times 1/100$ were w_t=terminal body weight, w_0=initial body weight, t=duration of experiment.
*5:Calories were caiculated as follows: Calories=Total food consumed$\times$3.4
where 3.4 was a caloric value of commercial pelleted diet for flounder (kcal/g) described on a cataiog of Higashimaru Food inc..

$$\text{Total calories}=\Sigma\, 0.007(e^{0.054T})[W_0(1+G_s/100)^n]^{0.75} + 1.47[W_0(1+G_s/100)^n]^{0.10}G_g, \quad (8)$$

where T=water temperature (20℃ is here), W_0 =initial body weight (g), G_s=growth rate (%/day), G_g=growth rate (g/day), n=n_{th} day. The results of the total calories for three size groups (16g, 88g and 176g) are showed in Table 4. The estimated total caloric values calculated from our general equation were slightly higher with the exception of 16g size group than the calculated values from the Iwata's data. The differences between them were within 10%. Therefore the equation derived from this study was thought to be applicable to field estimation.

Growth and life history of wild Japanese flounder in the Seto Inland Sea has been investigated previously by Maehara (1992), who reported that larval flounder settled on sandy beaches in late May or early June, grew to about 100mm total length (TL) by early August, and reached about 250mm TL by early December. As weight-length and length-day relationships have been reported (Maehara, 1992), a preliminary estimation of the food requirements of wild fish in the Seto Inland Sea is possible. According to the length-day and weight length relationships determined by Maehara (1992), the mean length and weight of young flounder on August 1 are 98mm and 7.2g, respectively. After 40 days the fish grow to 144 mm and 24.7g. Therefore, the estimated daily specific growth rate during this period is 3.13% and daily growth in g is 0.44g/day. Substituting 3.13%/day for G_s, 0.44g/day for G_g, 7.2g for W_0 and 23.3℃, which is the mean temperature during August to September in the western part of the Seto Inland Sea (M. Fukuda: Natl. Res. Inst. Fish. Sci., unpublished data), for T in equation (8) of this study, the estimated value of the daily ration in kcal for young Japanese flounder is a total of 40.3kcal for 40 days. Converting this total caloric value to the weight of squid meat (1.16kcal/g), total food consumption reached 34.8g. The growth efficiency calculated from increment of body weight (24.7g−7.2g= 17.5g) and total food intake (34.8g) of these population is 0.50. Since water content of squid fillets used in this study was 78%, total food intake in dry weight basis was equivalent to 7.7g. Therefore the growth efficiency in wet weight of fish per dry weight of food was 2.3. Koshiishi and Yasunaga (1980) reported that the food conversion efficiency (wet/dry basis) of Japanese flounder in 8.8g to 88g size group ranged from 0.92 to 1.24 in rearing experiments. The value of 2.3 was about two times higher than these values. Seikai *et al.* (1997) showed food

conversion efficiencies were always higher in Japanese flounder juveniles fed on live mysids than fed on formula food under rearing conditions. The authors obtained the maximum efficiency of 3.00 (wet/dry basis) at 22℃ in 250mg size fish and mentioned live misids are high quality as food for juvenile flounder. This implies the food conversion efficiencies obtained from field caught fish might be higher than rearing fish. One of the another reasons caused by high conversion efficiency is that the equation estimated in the present study did not consider the energy required for swimming. Though juvenile flounder does not seem to be active swimmers like pelagic fish, they need energy for feeding and escape from predator. Thus, our estimates of daily ration are probably lower than the actual value. Further studies might be needed to estimate the ration levels of field caught Japanese flounder using such an empirical equation.

Acknowledgment

We would like to thank Dr. Y. Masaki for critically reading the manuscript. We also appreciated two anonymous reviewers for their constructive comments on the manuscript.

References

Iwata N., Kikuchi K., Honda H., Kiyono M., and Kurokuwa H., 1994: Effects of temperature on the growth of Japanese flounder. *Fish. Sci.*, **60**, 527-531.

Jones R., 1978: Estimates of the food consumption of haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) and cod (*Gadus morhua*). *J. Cons. int. Explor. Mer.*, **38**, 18-27.

Jones R. and Hislop J.R.G., 1978: Further observations on the relation between food intake and growth of gadoids in captivity. *J. Cons. int. Explor. Mer.*, **38**, 244-251.

Koshiishi Y. and Yasunaga Y., 1980: Some aspects of feeding characteristics of juvenile plaice, *Paralichtys olivaceus*. *Bull. Jap. Sea Reg. Fish. Lab.*, (**31**), 33-40.

Maehara T., 1992: Studies of age and growth of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, in Ehime prefectural area of Seto Inland Sea. *Bull. Ehime Pref. Fish. Exp. St.*, **5**, 13-29.

Seikai T., Takeuchi T., and Park G.W., 1997: Comparison of growth, feed efficiency, and chemical composition of Juvenile flounder fed live mysids and formura feed under laboratory condition. *Fish. Sci.*, **63**, 520-526.

Yamashita Y., Nagahora S., Yamada H., and Kitagawa D., 1994: Effects of release size on survival and growth of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* in coastal waters off Iwate prefecture, northeastern Japan. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **105**, 269-276.

水研センター研報，第4号，19−24，平成14年
Bull. Fish. Res. Agen. No. 4, 19-24, 2002

Comparison of larval shell morphology of two coastal turbinid snails, *Turbo (Batillus) cornutus* and *Turbo (Marmarostoma) stenogyrus* (Vetigastropoda: Turbinidae)

Naoaki KONO[*1] and Hiroshi YAMAKAWA[*2]

Abstract Larval shell morphology was compared to determine criteria for the identification of larvae and juveniles of two coastal turbinid snails, *Turbo (Batillus) cornutus* and *Turbo (Marmarostoma) stenogyrus*: long axial length, short axial length, aperture diameter and surface sculpture. For all three morphological parameters of the larval shell, *T. cornutus* was smaller than *T. stenogyrus*, for example the mean long axial length being 267 μm and 303 μm, respectively. Several differences were detected between the two species in the surface sculpture of the larval shells based on scanning electron microscope observations. Distinction could be achieved between the two species even for snails in which the postlarval shell had partially covered the larval shell. The current results allow the differentiation for all life stages of the postlarval stages between *T. cornutus* and *T. stenogyrus* and therefore facilitate ecological studies of the postlarval stages.

Key words: larval shell morphology, Turbinidae, SEM, *Turbo (Batillus) cornutus*, *Turbo (Marmarostoma) stenogyrus*

Turbo cornutus is distributed around Japan, and *Turbo stenogyrus* is distributed from central to western Japan and in the tropical Pacific (Okada, 1982). The two species inhabit rocky shores sympatrically, and their distributions overlap from central to western Japan.

Adults of *T. cornutus* grow up to 10 centimeters in shell height and often develop spines on postlarval shells, while those of *T. stenogyrus* grow up to only 35 millimeters and have no spines (Okada, 1982). Therefore adults of two species are easily distinguished on shell morphology. However distinction of two species in the early life stages is difficult, as the postlarval shell morphologies of juveniles are similar to each other (Yamazaki and Ishiwata, 1987). The trochophore larva of the two species secretes a larval shell and then develops into a veliger larva. *T. cornutus* hatches as the trochophore larva and has a planktonic stage for a few days after hatching. *T. stenogyrus* remains in the egg-capsule from the trochophore to the veliger larval stage and hatches out as a benthic juvenile. The veliger larva of the two species forms a postlarval shell from the aperture of the larval shell after settlement. Therefore, the two species just after settlement have no development of postlarval shell (Ai, 1965; Hayashi, 1983a; Kono and Yamakawa, 1999).

Before settlement, larvae of the two species are not collected together because of the difference of developmental pattern mentioned above. At just after settlement, it is possible to distinguish the two species by differences of the lar-

2002年3月25日受理（Received on March 25, 2002）
水産総合研究センター業績 A 第19号（Contribution No. A 19 from the Fisheries Research Agency）
*1 瀬戸内海区水産研究所 〒739-0452 広島県佐伯郡大野町丸石2-17-5 (National Research Institute of Fisheries and Environment of Inland Sea, 2-17-5 Maruishi, Ohno, Saeki, Hiroshima 739-0452, Japan).
*2 東京水産大学 〒108-8477 東京都港区 (Tokyo University of Fisheries, Konan, Minato, Tokyo 108-8477, Japan).

val shell morphology, i.e., aperture shape, surface sculpture and shell size (Yamazaki, 1992). Further, for juveniles from 2.5-10.0 millimeter shell height, it is possible to separate the two species by differences in the postlarval shell morphology, i.e., the shape of the lower part of a columella, the shape of 3 spiral ribs, the occurrence of 2 weak ribs between the cords, and spines on the operculum (Yamazaki and Ishiwata, 1987). However there is no information about criteria for the distinction of the two species in the size range from just after settlement to 2.5 millimeter shell height. To estimate the mortality rate in the early life stage after settlement, it is important to distinguish the two species for this stage.

The objective of this study is to determine the criteria to distinguish *T. cornutus* and *T. stenogyrus* in the size from just after settlement. If it is possible to distinguish the two species in this stage, distinction through all the early life stages after settlement will be achieved. This will contribute to the promotion of ecological field studies of the early life history of both these species.

Materials and Methods

Specimens of *T. cornutus* were larvae and juveniles reared for stock enhancement purposes in 1990 and 1992 at the Kanagawa Prefectural Fisheries Research Institute (Misaki City) and were sampled at 1, 14 and 40 days after settlement. Those of *T. stenogyrus* were juveniles reared for experiments on its early developmental biology (Kono and Yamakawa, 1999) and were sampled at 5, 50, 60 and 70 days after settlement. Specimens were fixed with neutralized 10% formalin-seawater and then preserved in 70% ethyl alcohol until measurements and observations.

Length of long axis, short axis, and aperture diameter were measured for the comparison of the larval shell morphology. Measurements were made according to Hayashi (1983b); the length of each part was measured on the adapical side of the larval shell (Fig. 1).

All measurements were made using a compound microscope equipped with a calibrated ocular micrometer. As the postlarval shell develops discoidal for the first whorl and has been shown to progressively cover the periphery of the larval shell in *T. cornutus* (Ai, 1965; Hayashi, 1983a), the measured values of the observable part of the larval shell are estimated as smaller than the real size with the development of the postlarval shell. Taking this into account, measurements were made on specimens which were classified into the following three stages based on the degree of the postlarval

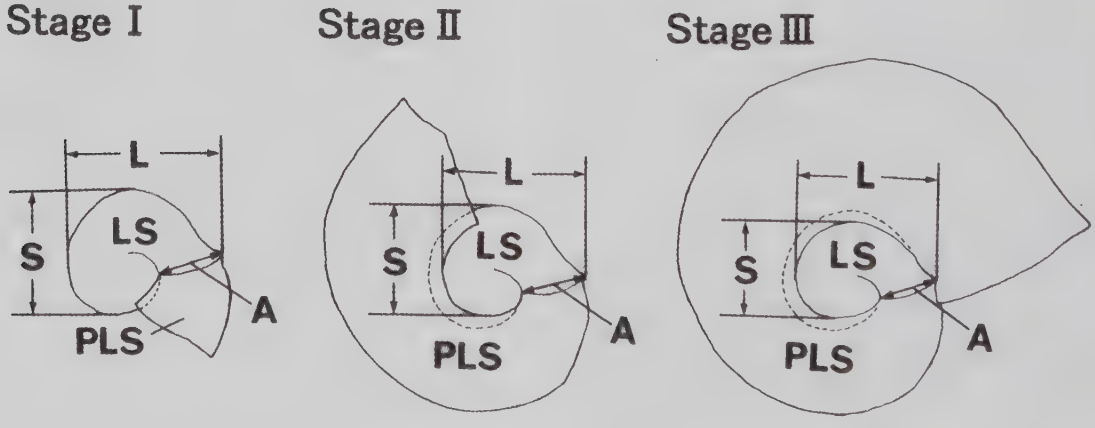


Fig. 1. Measurement baselines (L: long axial length; S: short axial length; A: aperture diameter) of the larval shell (adapical side) at the three developmental stages. LS: larval shell; PLS: postlarval shell.
Stage I : specimen with less than 1/4 of a whorl of the postlarval shell;
Stage II : from 1/2 to 3/4 whorl; Stage III : more than one whorl.

Table 1. Details of specimens and comparision of the size (mean±SD) of larval between *Turbo cornutus* (Tc) and *Turbo stenogyrus* (Ts). Data in parentheses represent the size range.

Stage	I		t	II		t	III		t
Species	Tc	Ts		Tc	Ts		Tc	Ts	
Days after hatching(Days)	1	5		14	50, 60 and 70		40	50, 60 and 70	
Sample number	61	41		61	5		11	6	
Shellwidth(μm)	348±44 (269~ 450)	365±43 (317~ 482)		629±36 (450~ 606)	698±104 (563~ 838)		1111±143 (865~ 1297)	1025±117 (813~ 1138)	
Long axial length(μm)	270±6 (253~ 283)	328±7 (317~ 346)	45.090**	259±8 (241~ 278)	307±11 (297~ 325)	12.352**	267±10 (255~ 284)	303±7 (291~ 313)	7.879**
Short axial length(μm)	201±6 (188~ 216)	249±6 (237~ 269)	39.127**	193±8 (173~ 206)	231±5 (223~ 238)	10.255**	189±15 (165~ 206)	203±9 (197~ 219)	2.140*
Aperture diameter(μm)	136±12 (114~ 175)	158±8 (140~ 173)	10.055**	134±10 (113~ 159)	150±7 (144~ 163)	3.430**	133±7 (124~ 148)	148±6 (141~ 156)	4.525**

*: $p<0.05$; **: $p<0.001$

shell development (Fig. 1, Table 1), namely, stage I : specimens with less than 1/4 of a whorl of the postlarval shell, stage II : from 1/2 to 3/4 whorl, stage III : more than one whorl.

Specimens for surface sculpture observations were dehydrated in 99.5 % ethyl alcohol. After air-drying on a petri dish, they were coated with gold using a Hitachi E-1030 ion spattering apparatus. All observations were made using a Hitachi S-4000 scanning electron microscope under an accelerating voltage of 10kV.

Results

Measurements of larval shells

Among the measured parts of the larval shells, the lengths of *T. cornutus* were shorter than those of *T. stenogyrus* for all stages (Table 1). All measured values of the larval shells significantly differed (t-test, short axis in stage III : $p<0.05$, all other measurements: $p<0.001$). For the long axis of all stages, and the short axis of stages I and II , the range of the lengths did not overlap between the two species.

The exposed part of the larval shells remained observable on the postlarval shells of *T. stenogyrus* in stage II (70 days after settlement) and *T. cornutus* in stage III (40 days) (Fig. 2-E, F). At these stages it was possible to measure the long axial length, short axial length and aperture diameter, were 327, 233 and 155 μm in *T. stenogyrus* versus 280, 208 and 138 μm in *T. cornutus*, respectively.

Observations of the larval shells using SEM

There were some similarities between the two species in the pattern of surface sculpture and the aperture shape on the larval shells; (1) the pattern is formed by many irregular ornaments scattered on the larval shell (Fig. 2-A, B) and repeats in all specimens although there are slight variations in the size and the form of the ornaments among individuals, (2) the size and height of the ornaments reduce toward the central part of the larval shell (Fig. 2-C, D), and (3) the density of the ornaments is roughly the same between the adapical and abapical sides, and (4) the apertures of the larval shells have a rapid outward expansion.

On the other hand, there were some differences between the two species in the pattern of the surface sculpture and the aperture shape. The characters of each species and the differences between the species are described as follows. In *T. stenogyrus*, the ornaments on larval shell are relatively dense, frequently connect with each other and form a reticular pattern. No spiral ridges and radiated patterns are observed. The expansion of the aperture is more marked than that of *T. cornutus*. In *T. cornutus*, ornaments on the larval shell is relatively sparse, a few discontinuous spiral cords are formed parallel on the periphery of the larval shell. Between the ridges, about 10 discontinuous

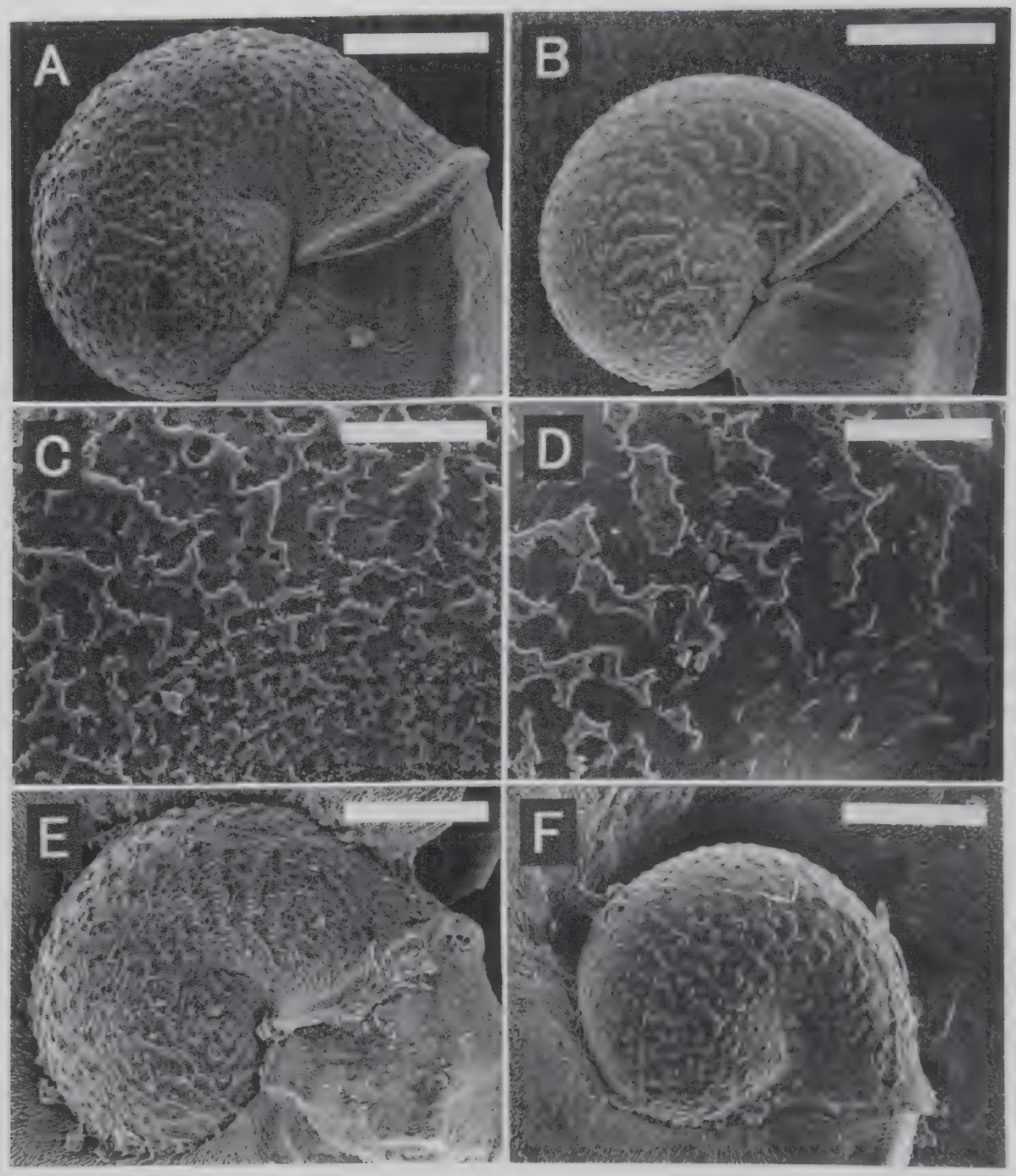


Fig. 2. Scanning electron micrographs of the larval shell of the two turbinid snails, *Turbo (Marmarostoma) stenogyrus* and *Turbo (Batillus) cornutus*. Left side (A, C, E): *T. stenogyrus*; right side (B, D, F): *T. cornutus*. A-B: Newly settled juveniles, 5 days (left) and 14 days (right) after settlement. Scale=100 μm. C-D: Central section of the larval shell, 5 days (left) and 14 days (right) after settlement. Scale=30μm. E-F: Larval shell of juveniles, 70 days (left) and 40 days (right) after settlement. Scale=100μm.

patterns often radiate from the center of the larval shell toward the periphery. The expansion of the aperture is relatively weak. No differences were found in the surface sculpture on the larval shells between the 1990 and 1992 specimens.

On the larval shell of *T. stenogyrus* in stage II and *T. cornutus* in stage III, it was possible to readily detect using SEM the characters of each species as stated above (Fig. 2-E, F).

Discussion

The larval shell of the haliotid, *Haliotis discus hannai*, begins to mineralize 21 hours after hatching, and the planispiral morphology is completed by 40-45 hours. No growth increments in the larval shell were observed on the surface thereafter (Iwata, 1980). This indicates that the outer shape of the larval shell such as the size and the surface sculpture does not change after the completion. The formation of the larval shell requires 27 hours to complete after hatching in *T. cornutus* and 32 hours in *T. stenogyrus* (Ai, 1965; Kono and Yamakawa, 1999). If characteristic features of each species occur in the morphology of the larval shell, they are effective criteria for the identification between these two species.

In all three stages used in this study, the range of the long axial length of the larval shell of *T. cornutus* and *T. stenogyrus* did not overlap and therefore it was possible to distinguish the two species after settlement based on measurements of the long axial length. Yamazaki (1992) showed that the long axial length of *T. cornutus* was smaller than that of *T. stenogyrus* just after settlement, equivalent to stage I in this study, and their ranges did not overlap. This result agrees with the findings of this study. It was, therefore, found that the long axial length is an important criterion to distinguish juveniles of the two species with a postlarval shell, as well as for juveniles just after settlement.

In both species, distinct patterns of surface sculpture and the aperture shape of larval shells were recognizable from the SEM observations. The surface sculpture of *T. stenogyrus* was denser than that of *T. cornutus* and formed a reticular pattern. The expansion of the aperture of *T. stenogyrus* was more marked than that of *T. cornutus*. Hayashi (1983a) described a sudden outward expansion of the aperture just before settlement, some discontinuous cords running in the direction of growth and irregular forms of projections among the cords based on SEM observations of larval shells of *T. cornutus*. Present study supports these previous observations. Yamazaki (1992) showed that it is possible to distinguish the two species just after settlement based on differences of the surface sculpture and aperture shape under an optical microscope; ornaments of *T. cornutus* were more discontinuous than that of *T. stenogyrus* and the expansion of the aperture of *T. cornutus* was smaller than that of *T. stenogyrus*. However there are only illustrations of part of the surface sculpture in Yamazaki (1992). Moreover the ornaments of *T. stenogyrus*, were described as "well-developed and continuous", were not illustrated with a reticular pattern. The illustration of *T. stenogyrus* in Yamazaki (1992) is similar to that of *T. cornutus* in this study. This difference may be caused by differences in the resolution and the depth of field between observation techniques. Therefore it is necessary to note that an available standard of the surface sculpture is different by a kind of a microscope used. The increase of shell height leads to a decrease in the light transmittance and makes observations of the surface sculpture under an optical microscope difficult. Observations under SEM as carried out in this study allow greater clarity of the distinction of the two species with a postlarval shell because of the greater depth of field.

Hayashi (1983a) pointed out that the surface sculpture variation at the species level might be caused by differences of environment factors such as water temperature, salinity etc. during development. For *T. cornutus*, no differences between the 1990 and 1992 specimens were found in the surface sculpture. Accordingly the surface sculpture variation might not be caused by differences of environment factors.

In both species, the larval shell was exposed on the postlarval shell for several months after settlement. Moreover, it was possible to distinguish the two species by measurements of the long axial length of the larval shell and observations of the surface sculpture and development of prominent axial ridge at larval-postlarval shell boundary under SEM in the postlarval stage. Hayashi (1983a) reported that it was possible to recognize the surface sculpture on the

larval shell of haliotids, *Haliotis* (*Nordotis*) *discus discus*, for 40 days after settlement using SEM. In some prosobranch species, the larval shell remains on the postlarval shell for at least several months after the onset of the formation of the postlarval shell (e.g., Iwata, 1980; Lima and Lutz, 1990; Ramón, 1990). This indicates that observations of the larval shell using SEM can be used as an effective method for the distinction between species for several months after the onset of the formation of the postlarval shell.

In conclusion, it was possible to distinguish between juveniles of *Turbo cornutus* and *Turbo stenogyrus* in the size range from just after settlement (<0.4mm) to a few millimeters in shell height even if the periphery of the larval shell is partially covered by the postlarval shell. Firstly measurements of the long axial length of the larval shell and/or observations of the surface sculpture and development of prominent axial ridge at larval-postlarval shell boundary under an optical microscope are recommended to differentiate between the two species because there are easy and reliable methods. Observations of the surface sculpture and development of ridge under SEM are effective if it is not possible to measure the long axial length because of the loss of a part of the larval and postlarval shell or to observe the surface sculpture and development of ridge under an optical microscope because of the decrease of transmittancy with the growth of the postlarval shell.

Acknowledgements

We would like to thank Dr. M. Omori, Dr. H. Ishii, Tokyo University of Fisheries, for their critical reviews and Prof. H. Fukuda for his technical suggestions. We also thank the staff of the Kanagawa Prefectural Fisheries Research Institute for providing specimens. Thanks are extended to Dr. Y. Koike, Mr. J. Ito, Mr. M. Mashiko and Mr. N. Ishikawa, the staff of the Banda Marine Laboratory, for their kind support during this study.

References

Ai T., 1965: Spawning and early development of the topshell, *Turbo cornutus* Solander- II. Induction of spawning and larval development. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **31**, 105-112.

Hayashi I., 1983a: Shell morphology of veliger larvae and juveniles of the Japanese top shell, *Turbo* (*Batillus*) *cornutus*. *Venus*, **42**, 212-216.

Hayashi I., 1983b: Larval shell morphology of some Japanese haliotids for the identification of their veliger larvae and early juveniles. *Venus*, **42**, 49-58.

Iwata K., 1980: Mineralization and architecture of the larval shell of *Haliotis discus hannai* Ino, (Archaeogastropoda). *J. Fac. Sci. Hokkaido Univ., Ser.* IV, **19**, 305-320.

Kono N. and Yamakawa H., 1999: Spawning and early development of the small turban shell, *Marmarostoma stenogyrus* (Vetigastropoda: Turbinidae). *Venus*, **58**, 217-221.

Lima G. M. and Lutz R. A., 1990: The relationship of larval shell morphology to mode of development in marine prosobranch gastropods. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, **70**, 611-637.

Okada K., 1982: New Illustrated Encyclopedia of the Fauna of Japan [II], 8th ed., Hokuryukan, Tokyo, 803pp.

Ramón M., 1990: Spawning and development of *Calliostoma granulatum* in the Mediterranean Sea. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, **70**, 321-328.

Yamazaki A., 1992: Discrimination of two turban shells (Turbinidae: Gastropoda) on the larval shell forms. *Ann. Rep. Mar. Ecosystems Res. Ctr., Chiba Univ.*, **12**, 31-32.

Yamazaki A. and Ishiwata N., 1987: Population ecology of the spiny turban shell *Batillus cornutus*. II. Habitat of juvenile shell. *La mer*, **25**, 184-189.

水研センター研報，第4号，25-32，平成14年
Bull. Fish. Res. Agen. No. 4, 25-32, 2002

広島湾におけるアマモ草体中の炭素および窒素総量

寺脇利信[*1]，玉置　仁[*2]，西村真樹[*2]，吉川浩二[*1]，吉田吾郎[*1]

Total amount of carbon and nitrogen in *Zostera marina* in Hiroshima Bay, western Seto Inland Sea, Japan

Toshinobu TERAWAKI[*1], Hitoshi TAMAKI[*2], Masaki NISHIMURA[*2], Koji YOSHIKAWA[*1], and Goro YOSHIDA[*1]

Abstract The total amount of carbon and nitrogen in *Zostera marina* was surveyed in Hiroshima Bay, Western Seto Inland Sea. Three study stations were selected in *Zostera* beds on sandy coasts of islands from the northern area to the mouth of the bay. Quantitative sampling using 100cm^2 (25cm by 40cm) quadrate in triplicate were conducted by SCUBA divers at D.L.(based on Datum Level) 0～1m as the central depth of the vertical distribution of the *Zostera* beds at each study station. The standing crop of *Z. marina* during the spring luxuriant season were 0.20kg.d.w./m^2 (aboveground: 0.16kg.d.w./m^2, belowground: 0.04kg.d.w./m^2). The average carbon content in the total plant body of *Z. marina* was estimated at 32.3% for the aboveground and belowground parts, through the year. The average nitrogen content in the total plant body of *Z. marina* was estimated at 1.9% for the aboveground and belowground parts. The total amount of carbon and nitrogen in *Z. marina* at Hiroshima Bay was calculated as 164 tons and 10 tons based on the total area of *Zostera* beds of 254 ha and total plants biomass of 508 tons (dry weight).

Keywords: carbon, nitrogen, *Zostera marina*, Seto Inland Sea, Hiroshima Bay

浅海域の砂泥海底において大型海草アマモ*Zostera marina* L.の群落を中心として形成されるアマモ場は，潮間帯やサンゴ礁域等とともに，海洋生態系における不可欠な構成要素である（山本，1973）。アマモ場は，多くの魚介類の産卵・保育場となり，また，餌料等を提供することから，漁業生産上きわめて重要な場であるだけでなく，大気中CO_2濃度の増加に対する有効な炭素貯蔵場として着目されている(Smith, 1981; 徳田ら，1987)。アマモの生理・生態，魚類・動物群集の生活史におけるアマモ場の役割，およびアマモ場の消長と漁業生産との関係等について，日本水産資源保護協会（1982）の報告がある。近年，アマモ場造成に関係する総説も刊行された（水産庁中央水産研究所，1997)。

瀬戸内海西部の広島湾では，植物プランクトンによる一次生産を基礎としたエネルギーフローならびに物質循環の現状把握が，中心的に進められているが (岡市ら，1996)，大型海草による一次生産が広島湾の生態系において果たしている役割は未解明である。その一方で，アマモ場については，その生態学的な重要性が強く認識されてきており，近年，広島湾における衰退機構および回復技術に関する研究が活発である。水質汚濁に伴う葉上堆積浮泥の影響による衰退機構（玉置ら，1999; Okada *et al.*, 1999)，および氾濫河川からの浮泥供給による消滅事例（平岡ら，2001）が明らか

2002年3月27日受理（Received on March 25, 2002）
水産総合研究センター業績 A 第20号（Contribution No. A 20 from the Fisheries Research Agency）
*1 瀬戸内海区水産研究所　〒739-0452　広島県佐伯郡大野町丸石2-17-5 (National Research Institute of Fisheries and Environment of Inland Sea, Maruishi, 2-17-5 Ohno, Saeki, Hiroshima 739-0452, Japan).
*2 広島大学大学院工学研究科　〒739-8527　広島県東広島市鏡山1-4-1　(Graduate School of Engineering, Hiroshima University,1-4-1 Kagamiyama, Higahi-Hiroshima 739-8527, Japan)

にされた。一方，消滅・衰退した藻場の回復技術の開発に資する観点から，石積み護岸マウンド沿いの海草植生の把握（寺脇ら，1998），移植実験によるアマモの生育制限要因の検討（平岡ら，2000），および花枝を用いた播種法の現地実験（吉川，寺脇，2000）等も進められている。

沿岸海域の生物生産機能および物質循環機構に果たすアマモ場の役割をより正確に解明するためには，アマモ草体による炭素・窒素などの吸収・固定，体外排出，呼吸や枯死による流出，被食による系外への流出などの収支を把握することが必要である。広島湾では，岩礁海底に生育する海藻類の水平・垂直分布様式の把握（寺脇ら，2001）に加え，炭素・窒素含量とその季節変化の解明（吉田ら，2001）が進んでいる。しかし，広島湾の砂泥海底に分布するアマモ草体の炭素・窒素固定量は明らかにされていない。

本研究は，広島湾内について，アマモ草体の現存量および炭素・窒素含量を明らかにし，既知のアマモ場面積を用いて草体中の炭素・窒素総量を算出し，海草による基礎生産を起源とする炭素固定量および窒素等栄養塩類の循環機能の解明に資する。

試料と方法

調査地の概要

広島湾内の廿日市市の阿品地点（St. 1），保高島地点（St. 2）および屋代島の大鼻地点（St. 3，以後，屋代島地点と略する）の南東方向に海面が開けている地先のアマモ場を，調査地点として選定した（Fig. 1）。これらの調査地点では，主に冬の北西の季節風など北から西の風によって発達する波浪の影響は小さく，一方，低気圧や台風通過時の南から東の波に直接さらされる。調査地点の中で，風によって発達する波の大きさを決定する吹送距離が最も長いのは屋代島である。屋代島の内側の広島湾内では，連続して分布する島嶼部によって，吹走距離が短くなり，波の発達程度は，基本的には小さくなる。一方，夏季と冬季において，湾北部では，水温差15℃，塩分差 5psu，湾口・安芸灘部では，水温差10℃，塩分差 2psuであり，湾北部で水温・塩分の変動が大きい（環境庁，1988）。広島湾内の透明度は，全域で年平均 5m以下であり，豊後・紀伊の両水道（年平均12.5m以上）の半分以下と低い（環境庁，1988）。広島湾における夏の表層のCODは，広島港で 6 ～ 8mg/L，厳島周辺で 4 ～ 6mg/L，阿多田島周辺で 3 ～ 4mg/L，柱島・屋代島周辺で 1 ～ 2mg/Lと，湾北部ほど高くなっている（環境庁，1988）。

方　　法

広島湾における水中計測による草丈と株密度の調査によって，アマモは，春から夏に繁茂し，秋から冬に衰退することが知られている（玉置ら，2001）。そこで，広島湾における，アマモの現存量を把握するため，繁茂期の1999年 6 月から 8 月および翌2000年 6 月から 7 月，衰退期の1999年12月，および生長期の翌2000年 2 月から 3 月に調査を行った。

各調査地点において，アマモ場の分布中心の水深帯であるD.L.（基準水面 Datum Level）基準の水深 0 ～ 1 mで，25×40cmの方形枠を用い，3ヵ所ずつ，アマモの草体を採取した。採取したアマモを実験室に持ち帰り，株数，最大葉条長および花枝長を測定した後，

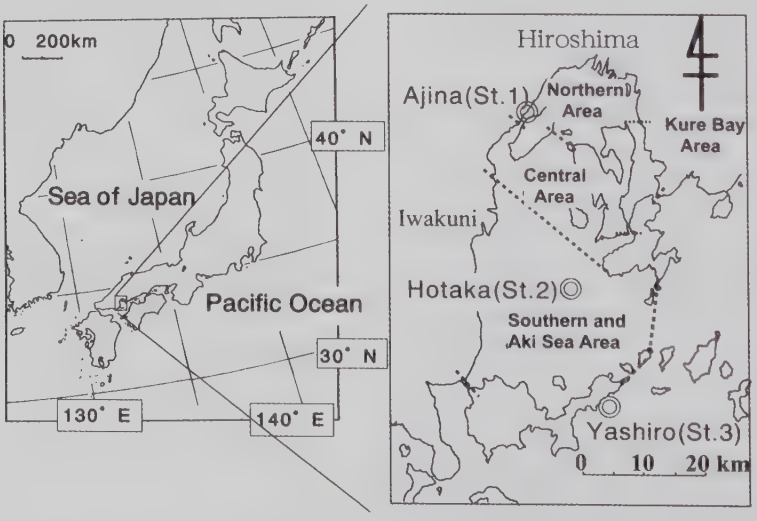


Fig. 1. Location of three sampling sites and divided four area of Hiroshima Bay

地下茎の第1節付近で地上部と地下部を切り離した。切り離したアマモ試料に付着した夾雑物を，海水で，できるだけ洗い落とし，ペーパータオルで表面の水分を取り除いた後，湿重量を測定した。

乾燥重量を基準とする草体の炭素含量ならびに窒素含量を把握するため，阿品地点の繁茂期，および各地点の衰退期について，草体試料の一部を乾燥機によって85℃で恒量に達するまで乾燥させ，乾重量を測定し，デシケータ中で保存した。アマモ地上部では一株あたり4から5枚備えている葉身のうち，個葉として生長期にあり（Umebayashi, 1988），かつ，株全体の炭素および窒素含量を代表する第2または第3葉（Umebayashi, 1989）を選び，地下部では重量の大部分を占める地下茎を選んで保存した。保存した試料について，Yanako CHN Corder MT-5により，1測定あたり3～6試料の炭素・窒素含量を測定した。

広島湾におけるアマモ場の総面積および湾内各部での分布状況を把握するため，環境庁・第4回自然環境保全基礎調査（1994）を元に，広島湾を，呉湾部，湾北部，湾中央部および湾口・安芸灘部に4区分し(Fig. 1)，それぞれの区分内のアマモ場面積を集計した。

なお、本文中では，集計・計算結果の中で，標準偏差を伴う場合には，平均値（±S.D.）等で表記する。

結　　果

アマモの季節的消長

最大葉条長：最大葉条長は，阿品地点で最も大きかった（Fig. 2)。阿品地点での最大葉条長は，1999年繁茂期と2000年繁茂期には140cmで同様であり，1999年から2000年の衰退期には年間最小の70cmであった。保高島地点での最大葉条長は，1999年繁茂期には50cmであったが，2000年繁茂期には30cmとなり，前年の繁茂期の60%に減少した。1999年から2000年の衰退期には年間最小の20cm以下となった。屋代島地点での最大葉条長は，1999年繁茂期には70cmであったが，2000年繁茂期には30cmとなり，40%に減少した。1999年から2000年の衰退期にはアマモ草体が認められなかった。2000年繁茂期の保高島および屋代島地点では，アマモ草体に魚類に噛み切られたとみられる短い草体が多かった。

株密度：繁茂期に採取された試料には1～2株の花枝（繁殖株）が含まれていたが，栄養株に含めて株密度を算出した。阿品地点での株密度は，1999年繁茂期には160株/m^2であったが，2000年繁茂期には270株/m^2となり，前年の繁茂期の170%に増大した（Fig. 3)。1999年から2000年の衰退期には年間最小の20株/m^2であった。保高島地点での株密度は，1999年繁茂期には430株/m^2であったが，2000年繁茂期には130株/m^2で30%に減少した。1999年から2000年の衰退期には年間最小の30株/m^2以下であった。屋代島地点での株密度は，1999年繁茂期には290株/m^2であったが，2000年繁茂期には90株/m^2で30%に減少した。両年とも衰退期にはアマモ草体が認められなかった。

地上部現存量：地上部現存量は，阿品地点で最も大きかった（Fig. 4)。阿品地点での地上部現存量は，1999年繁茂期には1.3kg.w.w./m^2であり，2000年繁茂期には5.3kg.w.w./m^2で410%に増大した。1999年から2000年の衰退期には年間最小の0.1kg.w.w./m^2であった。保高島地点での地上部現存量は，1999年繁茂期には0.8kg.w.w./m^2であり，2000年繁茂期には0.2kg.w.w./m^2で25%に減少した。1999年から2000年の衰退期には年間最小の0.01kg.w.w./m^2以下であった。屋代島地点での地上部現存量は，1999年繁茂期には0.5kg.w.w./m^2であり，2000年繁茂期には0.1kg.w.w./m^2で20%に減少した。両年とも衰退期にはアマモ草体が認められなかった。

地下部現存量：地下部現存量は，阿品地点で最も大きかった（Fig. 5)。阿品地点での地下部現存量は，1999年繁茂期には0.2kg.w.w./m^2であり，2000年繁茂期には0.8kg.w.w./m^2で400%に増大した。1999年から2000年の衰退期には年間最小の0.05kg.w.w./m^2であった。保高島地点での地下部現存量は，1999年繁茂期と2000年繁茂期には0.1kg/m^2で同様の値であり，1999年秋から2000年の衰退期には年間最小の0.01kg.w.w./m^2以下であった。屋代島地点での地下部現存量は，1999年繁茂期には0.02kg.w.w./m^2であり，2000年繁茂期には0.1 kg.w.w./m^2で500%に増大した。両年とも衰退期にはアマモ草体が認められなかった。

アマモ草体の乾・湿重量比

地上部の乾湿重量比は，阿品地点での繁茂期および各地点での衰退期とも9.0～14.1%であり，平均12.0（±2.2）%であった（Table 1)。地下部では，阿品地点での繁茂期および各地点での衰退期とも12.4～21.8%であり，平均15.6（±4.4）%であった。

アマモ草体の炭素・窒素含量

地上部の炭素含量は，繁茂期の阿品地点および衰退期の各地点とも31.3～33.5（平均32.5±0.9）%であった。地下部では，繁茂期の阿品地点および衰退期の各地点とも30.3～34.9（平均32.0±2.1）%であった（Table 2)。

地上部の窒素含量は，繁茂期の阿品地点で1.6%であった。衰退期の阿品，保高島および屋代島地点では増大し，2.6～3.0（平均2.9±0.2）%であった。地下部では，

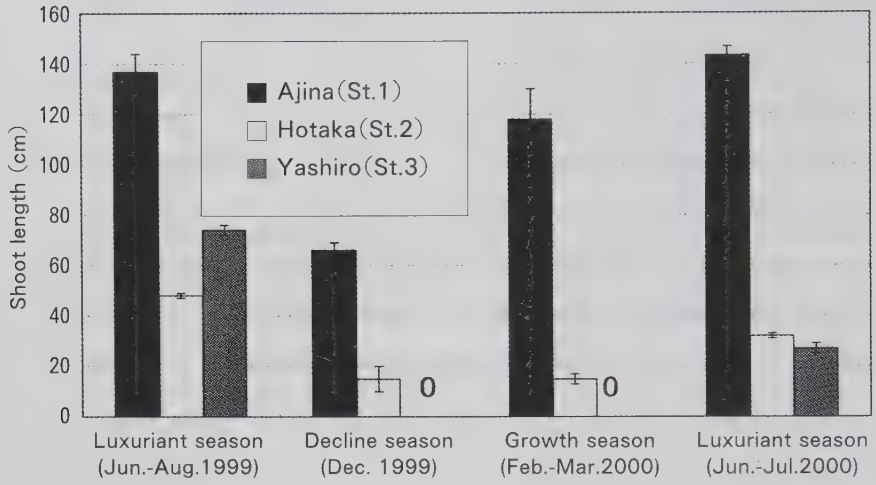


Fig. 2. Seasonal changes in shoot length of *Z. marina* at three stations in Hiroshima Bay. Bars indicate S.D.

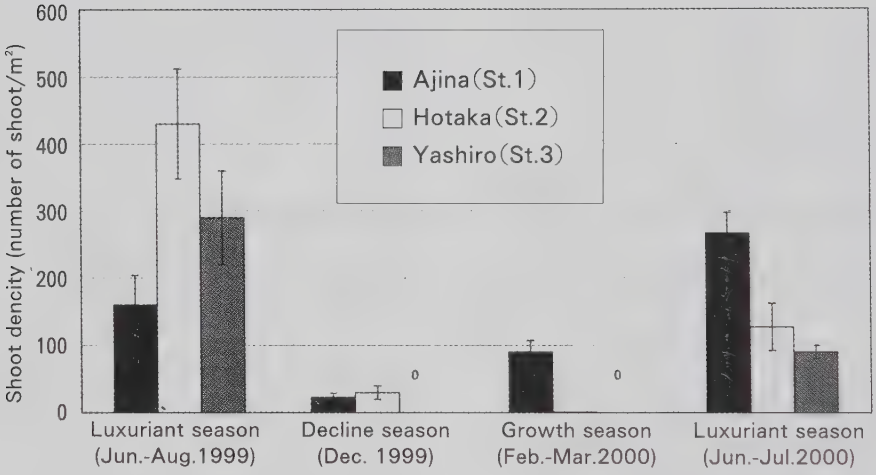


Fig. 3. Seasonal changes in shoot density of *Z. marina* at three stations in Hiroshima Bay. Bars indicate S.D.

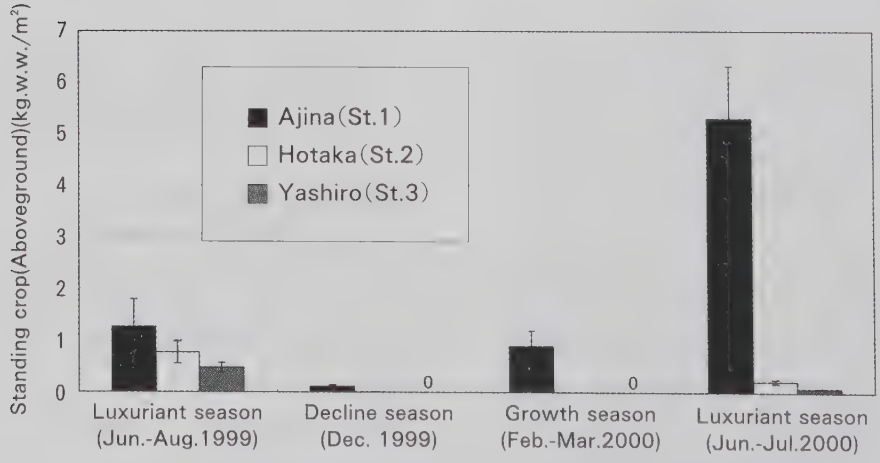


Fig. 4. Seasonal changes in standing crop of aboveground part in *Z. marina* in Hiroshima Bay. Bars indicate S.D.

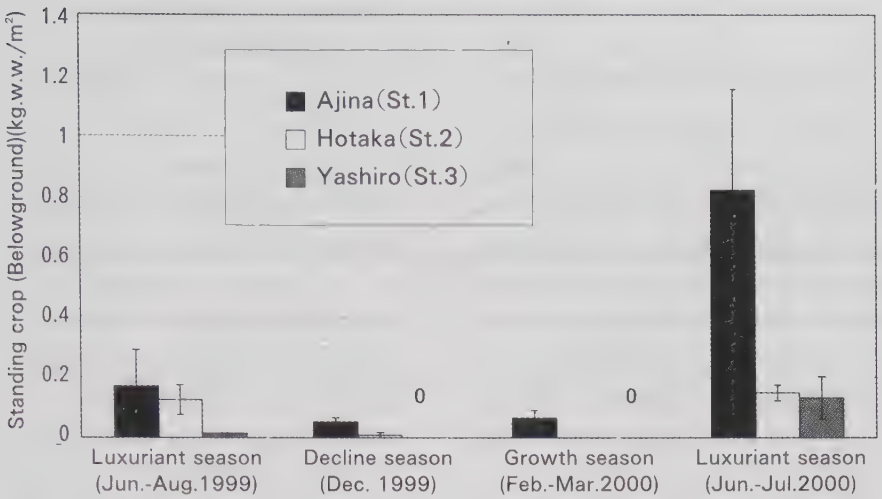


Fig. 5. Seasonal changes in standing crop of belowground part in *Z. marina* in Hiroshima Bay. Bars indicate S.D.

Table 1. Ratio of dry weight to wet weight(%) with S.D. of aboveground and belowground parts of *Z. marina* from different sampling sites and periods.

Part of plant	June,1999	December,1999		
	Ajina (St.1)	Ajina (St.1)	Hotaka (St.2)	Yashiro (St.3)
Aboveground	14.1±1.7	13.1±1.1	9.0±2.7	11.6±0.2
Belowground	15.5±4.1	21.8±7.5	12.5±5.9	12.4±1.5

Table 2. Carbon and nitrogen contents (% dry weight) with S.D. and C:N ratio (by weight) of aboveground and belowground parts of *Z. marina* from different sites and sampling periods.

Part of plant		June,1999	December,1999		
		Ajina (St. 1)	Ajina (St. 1)	Hotaka (St. 2)	Yashiro (St. 3)
Aboveground	C content	32.3±5.1	33.5±1.1	31.3±1.7	32.9±2.4
	N content	1.6±0.4	3.0±0.7	3.0±0.7	2.6±0.6
	C:N	20.8±4.4	11.7±2.5	11.0±2.8	12.9±2.4
Belowground	C content	34.9±1.8	32.1±2.9	30.8±1.9	30.3±1.5
	N content	0.6±0.7	3.3±0.6	2.5±1.9	1.8±1.1
	C:N	101.4±47.7	9.9±1.3	21.2±16.9	28.3±25.0

繁茂期の阿品地点で0.6%であり，衰退期の各地点とも増大し，かつ湾北部ほど高く，1.8～3.3（平均2.5±0.8）%であった。

地上部のC:N比は，炭素および窒素含量の変動に伴って変化した。繁茂期の阿品地点では20.8，衰退期の各地点では11.0～12.9（平均11.9±1.0）であった。地下部では，繁茂期の阿品地点が101.4，衰退期には湾口・安芸灘部で高く9.9～28.3（平均19.8±9.3）であった。

アマモ場面積

広島湾のアマモ場面積は，1991年時点において，呉湾部で6ha，湾北部で34ha，湾中央部で44ha，および湾口・安芸灘部で170haの，合計254haであった（環境庁自然保護局, 1994）。したがって，広島湾におけるアマモ場は，1991年時点において，総面積254haの内，呉湾部に2%，湾北部に13%，湾中央部に17%，および湾口・安芸灘部に68%が分布していた。

考　察

1999年および2000年の3地点における繁茂期のアマモ地上部現存量の平均値は，0.83kg.w.w./m²（±0.40）および1.87kg.w.w./m²（±2.98）であった。この両年の地上部現存量の平均値1.35kg.w.w./m²に，本研究で得られたアマモ地上部の乾湿重量比の0.12（Table 1）を乗じ，アマモ地上部の現存量概算値0.16kg.d.w./m²が得られた。1999年および2000年の3地点における繁茂期のアマモ地下部現存量の平均値は，0.10kg.w.w./m²（±0.08）と0.37kg.w.w./m²（±0.39）であった。この両年の地下部現存量の平均値0.24kg/m²に，本研究で得られたアマモ地下部の乾湿重量比（Table 1）の0.16を乗じ，アマモ地下部の現存量概算値0.04kg.d.w./m²が得られた。

広島湾におけるアマモの地上・地下部の合計値0.20 kg.d.w./m²は，広島湾に隣接する柳井湾の0.08（衰退期）～0.18（繁茂期）kg.d.w./m²（川端ら，1990）および瀬戸内海としての最大現存量0.24kg.d.w./m²（向井，1982）の中間の値であった。一方，本研究で得られた広島湾としての値は，日本海に面する能登半島飯田湾の年間極大値0.22～0.24kg.d.w./m²（谷口，山田，1979; 地上部と地下部を筆者らが合計した）とほぼ同様であったが，同じ日本海に面する舞鶴湾の0.68kg.d.w./m²（道家ら，2000），本州太平洋岸中部・三河湾の0.57 kg.d.w./m²（Umebayashi, 1989），太平洋岸北部の万石浦の1.01kg.d.w./m²（向井，1982）および北海道・根室海峡岸の野付湾の0.60kg.d.w./m²（水島，1985）より低かった。また，広島湾の値は，デンマーク（4地点）での最大現存量0.96kg.d.w./m²，アメリカ（15地点）での最大現存量2.04kg.d.w./m²およびソ連（3地点）での最大現存量0.90kg.d.w./m²（向井，1982）よりも低かった。アマモが分布する北半球における各地でのアマモの最大現存量は平均0.5kg.d.w./m²（McRoy, 1970）であることから，アマモの地理的分布の南限に近い広島湾（Den Hartog, 1970; Miki, 1933）において，アマモの単位面積あたり現存量は，世界平均の半分程度であることが明らかになった。

広島湾におけるアマモ草体の炭素含量は，通年にわたり，地上部の乾燥重量当たり炭素含量が32.5%，および地下部の乾燥重量当たり炭素含量が32.0%であり，地上部と地下部の平均炭素含量が32.3%となった。一方，地上部の窒素含量は2.6～3.0（平均2.9±0.2）%であった。地下部の窒素含量は，繁茂期の阿品地点では0.6%であり，衰退期には増大し，かつ湾北部ほど高く，1.8～3.3（平均2.5±0.8）%であった。そこで，両期の地上部および地下部の全平均によって，平均窒素含量が1.9%となった。アマモ葉身における有機物含量，C, N量は，葉が緑色をしている時に多く，古い葉，枯れ落ちた葉になるに従って少なくなり，また，生長の盛んな時期に多く，その後減少する（Harrison and Mann, 1975）。今回の結果は，葉身の発育段階や部位別のC含量とN含量の詳細な分布を検討したAioi and Mukai（1980）およびUmebayashi and Sasaki（1985）による，地上部ではC含量が40%前後でN含量が2～3%，地下部ではC含量が30～40%でN含量が1～2%という報告と，ほぼ同様の値となった。

本研究で明らかになった，アマモ草体の年間最大現存量，乾・湿重量比，炭素・窒素含量および広島湾のアマモ場面積を乗じ，広島湾沿岸域におけるアマモ草体中の炭素および窒素総量を推定する。ここでは，草体最大現存量0.2kg.d.w./m²，アマモ場面積（呉湾部6ha，湾北部34ha，湾中央部44ha，および湾口・安芸灘部170ha），草体の炭素含量32.3%および窒素含量1.9%を用いた。以上から，広島湾においては，アマモ場面積が254ha，繁茂期に，アマモ草体総量が508トン（乾燥重量），アマモ草体中の炭素総量が164トン，およびアマモ草体中の窒素総量が10トンと概算された（Table 3）。

広島湾におけるアマモは，繁茂期および衰退期の時期では既存の報告（玉置ら，2001）と一致した。しかし，アマモの繁茂期の地上部現存量は，湾北部の阿品地点で最大となり，2000年に1999年の4倍に増大した。

Table 3. Total amount of carbon and nitrogen in *Z. marina* estimated for four areas in Hiroshima Bay. Numerical values of standing crop (0.2 kg.d.w./m²), C content (0.32) and N content (0.02) obtained through this study were adopted in the calculation.

Divid areas in Hiroshima Bay	Area of *Zostera* bed(m²)	Total amount of plants (kg.d.w.)	Amount of Carbon in plants (kg)	Amount of Nitrogen in plants (kg)
Kure Bay area	60000	12000	3876	228
Nothern Area	340000	68000	21964	1292
Central Area	440000	88000	28424	1672
Mouth and Aki Sea Area	1700000	340000	109820	6460
Total	2540000	508000	164084	9652

また，湾口・安芸灘部の保高島地点および屋代島地点では2000年には1999年の1/4に地上部現存量が減少した。繁茂期の地下部現存量は，湾北部の阿品地点で最大となり，いずれの地点とも2000年には1999年に比べて同等または数倍に増大した。これらのことから，今後，アマモの現存量を多海域で比較する上では，比較対象の海域の詳細な立地環境および経年的な変動を含めて検討することが重要である。

アマモの地上部および地下部とも現存量が最大であった湾北部の阿品地点の結果から，湾北部では2000年の方が1999年よりも，アマモにとって生理的条件が適していたと推察される（Duarte C.M., 1991）。一方，湾口・安芸灘部の屋代島において，地下部の現存量が2000年の方が大きいにもかかわらず，地上部の現存量が小さかった理由は，草体に残された噛み後などから，近年報告の見られる日本南西海域の地点での海草・藻類への魚類による食害等（渡辺，仲岡，2000; 清本ら，2000）が想定される。

広島湾内のアマモ場は，10ha未満の小規模なものが大部分を占め，1ヵ所で10haを越えるアマモ場は岩国市地先以外にはみられない（環境庁自然保護局，1994）。瀬戸内海の小規模なアマモ場においては，海底の勾配が急であり，草体の被度が100%に迫る分布中心域は繁茂期においても比較的狭く，被度50%未満の範囲が広い（寺脇ら，1997）。特に，屋代島地点においては，衰退期に地上部および地下部ともアマモ草体が認められなかったことから，近年では，アマモが周年にわたっては生育しない1年生の状態となっている可能性も示唆された。

広島湾をモデル海域とした沿岸海域の生物生産機能および物質循環機構に果たすアマモ場の役割をより正確に解明するためには，アマモ草体の年間生産量の推定に基づく炭素・窒素などの吸収・固定，体外排出，呼吸や枯死による流出，被食による系外への流出などの収支の把握へ進むこととなる。その際，広島湾内でも，湾北部とアマモ場面積が最大の湾口・安芸灘部とでは，夏と冬の水温差，塩分差などの変動幅などが大きく異なっている（環境庁，1988）。ただし，それらの水質等の環境条件は，離岸距離と水深の大きな海洋観測点において取得された情報に基づいている。今後，海草の生長に影響を及ぼす生理的要因の観点のみならず，草食性魚類等の行動に影響を及ぼす生態的要因の観点からも，アマモ場等の近傍における水環境条件等を継続的に把握することが重要である。

謝　辞

本研究は農林水産技術会議のプロジェクト研究「森林，海洋等におけるCO_2収支の評価の高度化」および「環境研究・森林・農地・水域を通ずる自然循環機能の高度な利用技術の開発」の一部としても実施した。現地調査地点の確保に協力いただいた広島県立廿日市高等学校，大野町漁業協同組合，保高島漁業協同組合，東和町漁業協同組合，広島県水産試験場，山口県水産総合研究センター内海研究部の皆様にお礼を申し上げる。現地調査の実施に協力いただいた広島大学大学院工学研究科の小瀬知洋氏に厚く感謝する。本稿のとりまとめに当たり重要な教示を頂いた，瀬戸内海区水産研究所瀬戸内海海洋環境部長の井関和夫博士に謝意を表する。

要　約

広島湾内のアマモ草体中の炭素・窒素総量を算出し，海草による基礎生産起源の炭素固定量および窒素等栄養塩類の循環機能の解明に資することを目的とした。広島湾内のアマモ場に3調査地点を設け，繁茂期および衰退期に，分布中心の水深帯で，25×40cmの方形枠を用い，3ヵ所ずつ，アマモを採取した。採取したアマモについて，株数，最大葉条長および花枝長を測定し，地上部と地下部を切り離し，湿重量を測定した。試料の一部を乾燥し，乾重量を測定後，炭素・窒素含量を測定した。広島湾内では，繁茂期に，アマモ草体の現存量は0.20kg.d.w./m^2（地上部：0.16kg.d.w./m^2，地下部：0.04kg.d.w./m^2）であった。アマモ草体は，年間平均で，炭素含量が32.3%，窒素含量が1.9%と推定された。広島湾内のアマモ場面積254ha（呉湾部 6ha，湾北部34ha，湾中央部44ha，および湾口・安芸灘部170ha）において，繁茂期に，アマモ草体総量が508トン（乾燥重量），アマモ草体中の炭素総量が164トン，およびアマモ草体中の窒素総量が10トンと概算された。

文　献

Aioi K. and Mukai H.,1980: On the distribution of organic contents in plant of eelgrass (*Zostera marina* L.) . *Jap. J. Ecol.*, **30**, 189-192.

Den Hartog. C., 1970: The sea grass of the world. Verh, k. Ned. Akad. Wet. Afd. Natuurkd. Ser. 2, 59, 1-275, North Holland, Amsterdam.

道家章生，井谷匡志，葭谷　護，2000: 舞鶴湾におけるアマモ群落の特徴－I　密度，現存量，草丈組成の季節変化．京都海洋センター研報，**22**，22-28.

Duarte C.M., 1991: Allometric scaling of seagrass form and productivity. *Mar. Eco. Pro. Ser.*, **77**, 289-300.

Harrison P.G. and Man K.H., 1975: Chemical changes during the seasonal cycle of growth and decay in eelgrass (*Zostera marina*) on the Atlantic Coast of Canada. *J. Fish. Res. Brd. Can.*, **32**, 615-621.

平岡喜代典，高橋和憲，中原敏雄，寺脇利信，岡田光正，2000: 移植実験によるアマモの生育制限要因の検討．環境科学会誌，**13**, 391-396.

平岡喜代典，後藤義雄，寺脇利信，岡田光正，2001: 自然的要因によるアマモ場の消滅－氾濫河川からの浮泥供給による消滅事例の解析－.水環境学会誌，**24**, 153-158.

環境庁，1988: 瀬戸内海の環境－瀬戸内海環境情報基本図－．67pp.

環境庁自然保護局，1994: 第4回自然環境保全基礎調査海域生物環境調査報告書第2巻藻場．399pp.

川端豊喜，長谷川恒孝，富田伸明，1990: 柳井湾におけるアマモの生長様式とアマモ場造成試験．沿岸海洋研究ノート，**27**, 146-156.

清本節夫，吉村　拓，新井章吾，2000: 長崎県野母崎の潮下帯に生育する大型褐藻5種に対する藻食性魚類の採食選択性．西水研研報，**78**, 67-75.

McRoy C, P., 1970: Standing stocks and other features of eelgrass (*Zostera marina*) populations on the coast of Alaska. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, **27**, 1811-1821.

Miki S., 1933: On the seagrass in Japan (I) *Zostera* and *Phyllospadix*, with special references to morphological and ecological characters. *Bot. Mag.*, **47**, 842-862.

水島敏博，1985: 野付湾のアマモ現存量と生産量の季節変化．北水試研報，**27**, 111-118.

向井　宏，1982: アマモの生態と生理．海草藻場（特にアマモ場）と水産生物について．日本水産資源保護協会，1-48.

日本水産資源保護協会，1982: 海草藻場（特にアマモ場）と水産生物について．149pp.

Okada M., Tamaki H., Nishijima W. and Terawaki T., 1999: Deterioration of Eelglass, *Zostera marina* L., meadows by water pollution in Seto Inland Sea, Japan. *Proc. MEDCOAST99-EMECS99 Joint Conf.*, 124-132.

岡市友利，小森星児，中西　弘編，1996: 瀬戸内海の生物資源と環境－その将来のために，恒星社厚生閣，東京，272pp.

水産庁中央水産研究所，1997: 藻場の機能．水産業関係試験研究推進会議　資源増殖部会「テーマ別研究のレビュー」Ser.4, 110pp.

Smith S. V., 1981：Marine macrophytes as a gloval carbon sink. *Science*, **211**, 838-840.

玉置　仁，西嶋　渉，新井章吾，寺脇利信，岡田光正，1999: アマモ生育に及ぼす葉上堆積浮泥の影響．水環境学会誌，**22**, 663-667.

玉置　仁，吉田吾郎，寺脇利信，岡田光正，2001：アマモの天然群落と移植群落における季節消長の比較．藻類，**49**, 195-197.

谷口和也，山田悦正，1979: 能登飯田湾におけるアマモとその他海産顕花植物の垂直分布と生活史．日水研研報，**30**, 111-122.

寺脇利信，吉田吾郎，玉置　仁，薄　浩則，1998: 広島湾の石積み護岸マウンド沿いに成立した海草・藻類植生．南西水研研報，**31**, 13-18.

寺脇利信，重田利拓，新井章吾，1997: 燧灘における砂泥攪乱と植生．南西水研研報，**30**, 163-171.

寺脇利信，吉川浩二，吉田吾郎，内村真之，新井章吾，2001: 広島湾における大型海藻類の水平・垂直分布様式．瀬戸内水研研報，**3**, 73-81.

徳田　廣，大野正夫，小河久朗，1987: 海藻資源養殖学，緑書房，東京，354pp.

Umebayashi O., 1988: Individual leaf growth of vegetative shoot of Eelgrass *Zostera marina*. *Bull. Tokai Reg. Fish. Res. Lab.*, **125**, 1-13.

Umebayashi O., 1989: Eelgrass productivity on an intertidal flat of central Japan. *Bull. Tokai Reg. Fish. Res. Lab.*, **127**, 17-30.

Umebayashi O. and Sasaki K., 1985: Distributional pattern of phosphorus, nitrogen and carbon in a leaf blade of Eelgrass, *Zostera marina*. *Bull. Tokai Reg. Fish. Res. Lab.*, **118**, 21-32.

渡辺雅子，仲岡雅裕，2000: 海草の分布と生産に影響を与える環境要因・生物学的要因．海洋と生物，**131**, 533-541.

山本護太郎，1973: 海洋学講座，第9巻，海洋生態学，東京大学出版会，213pp.

吉田吾郎，内村真之，吉川浩二，寺脇利信，2001: 広島湾に生育する海藻類の炭素・窒素含量とその季節変化．瀬戸内水研研報，**3**, 53-61.

吉川浩二，寺脇利信，2000: アマモ花枝の流失防止試験．瀬戸内海ブロック藻類研究会誌，**1**, 10-13.

水研センター研報，第4号，33－39，平成14年
Bull. Fish. Res. Agen. No. 4, 33-39, 2002

宮島干潟におけるメイオベントス動物群－特に線虫類の現存量について－

辻野　睦[*1]，吉田吾郎[*1]，内田卓志[*2]

The meiobenthic community on the tidal flat of Miyajima in Hiroshima Bay, with special reference to the biomass of free-living nematodes

Mutsumi TSUJINO[*1], Goro YOSHIDA[*1] and Takuji UCHIDA[*2]

Abstract Meiobenthos communities were surveyed to clarify the composition of animal groups and to estimate the production of major taxa inhabiting the tidal flat of coarse substrate at Miyajima (Itsukushima Island) in Hiroshima Bay.

Nematoda formed the most major constituent of the meiobenthos in numerical abundance, accounting for 78% of the total miobenthos on the annual average. The density of Nematoda was highest in April at $2,620 \pm 888 \times 10^3$ indiv./m^2, and lowest in October at $780 \pm 307 \times 10^3$ indiv./m^2. Copepoda was the next most important taxon; its density was low from spring to summer and highest in October at $218 \pm 114 \times 10^3$ indiv./m^2, showing converse seasonal pattern compared with Nematoda.

Dry weight of Nematoda ranged on average from 0.32 μg/indiv. in December to 0.82 μg/indiv. in May. The biomass of Nematoda, calculated from the average dry weight and the density, peaked in May, and ranged 0.28～1.33g dry wt./m^2 or 0.08～0.40gC/m^2 during the study period. The production of Nematoda was estimated to be 44.3g dry wt./m^2・year or 13.5gC/m^2・year.

Keywords: meiobenthos, Nematoda, biomass

一般的に，干潟は生物生産の活発な場所であり，近年その高い生産量に支えられた浄化能力の重要性が高まっている。にもかかわらず，全国的には干潟の35%が，大阪湾では100%，東京湾では90%が埋め立てられている（佐々木，1994）。干潟のベントス現存量は沿岸部の浅海域と比較して明らかに多いが（佐々木，1994），この現存量の多さはマクロベントス（目合1mmの篩に残るベントス）によるところが大きく，メイオベントス（1mmの目合いを抜けるベントス）についてその現存量が明らかにされた例は少ない。近年，メイオベントスは海洋生態系における物質循環や生物生産に果たすその役割が注目され始めている（鬼頭，2000）。これまで，日本の浅海域で行われたメイオベントスの調査は少なく，干潟におけるメイオベントスの現存量および生産量に関する詳細な調査は数例に限られている（平川，熊田，1986; 平川ら，1988）。瀬戸内海においては，潮下帯の泥場における調査が大部分で（酒井1984，1985; 板岡，玉井，1993; 辻野，玉井，1996; 辻野ら，2000），干潟における調査は1例しかない（會澤，1988）。メイオベントスの現存量および生産量に関するこれまでの報告によると，メイオベントスの現存量は場所によってはマクロベントス現存量の20%以上にもなり（Warwick and Price，1979），生産量ではマクロベントスを上回るとする報告もある（Kuipers *et. al.*，1981）。これらのこと

2002年6月3日受理（Received on June 3, 2002）
水産総合研究センター業績 A 第21号（Contribution No. A 21 from the Fisheries Research Agency）
[*1] 瀬戸内海区水産研究所　〒739-0452　広島県佐伯郡大野町丸石2-17-5 (National Research Institute of Fisheries and Environment of Inland Sea, 2-17-5 Maruishi, Ohno, Saeki, Hiroshima 739-0452, Japan).
[*2] 北海道区水産研究所　〒085-0802　北海道釧路市桂恋116　(T. Uchida :Hokkaido National Research Institute, 116 Katsurakoi, Kushiro, Hokkaido 085-0802, Japan)

から,干潟域のベントス生産力を評価するためには, マクロベントスだけでなくメイオベントスの現存量を明らかにし, 生産量を推定することが重要である。

瀬戸内海広島湾の宮島干潟は春～夏にかけて潮干狩りの人が訪れ, 周辺の浜はアサリの増養殖漁場となっている等（大野町, 1989), 生物生産性の高い砂質の干潟と考えられる。我々は宮島の干潟のメイオベントスの生産構造を明らかにするため, この干潟においてメイオベントスの動物群組成および密度の季節変動を調べると同時に, メイオベントスの中で優占する動物群の一つである線虫類の出現属を調べ, 乾燥重量を測定して年間生産量を推定した。

方　　法

宮島の大鳥居脇の干潟において真潮間帯下部に1定点設定し（Fig. 1), 1999年４月16日, ５月13日, ８月11日, 10月12日, 12月６日の計５回, 干潮時にメイオベントスの採集調査を行った。泥温は棒状温度計で測定した。採泥については径3.7cmのコアを用いて 1m×1mのコドラート内をランダムに 3cm深まで８回行った。その内６本は5%中性ホルマリンで固定, ローズベンガルで染色してメイオベントス計数, 同定試料とした。残り２本は底質分析用試料とし, 酸揮発性硫化物濃度（AVS: acid volatile sulphide), 強熱減量（IL: ignition loss), クロロフィル量, 粒度組成を分析した。

メイオベントスは固定した試料をかきまぜ法（山西, 1979）によって篩で分別し, 40μm以上1000μm以下の分画について, 線虫類, 多毛類, コペポダイト期と成体を含むカイアシ類, ノープリウス幼生およびその他の個体数を計数した。また, ４月と10月の線虫類の試料についてはプレパラートを作製し, それぞれ約200個体を検鏡して線虫類の属構成を調べ, その口形から食性型（Wieser, 1953）を分類した。また, 各月のホルマリン固定したサンプル約300個体の乾燥重量を測定し, １個体あたりの乾燥重量を換算した。さらに, 乾燥重量に0.3を乗じて炭素量を求めた（平川, 1988)。線虫類の年間生産量の推定はVranken and Heip (1986) の式, 年間世代数×3×年間平均現存量,を用いて計算した。なお, 年間世代数は辻野ら（1997）の飼育実験をもとに18とした。

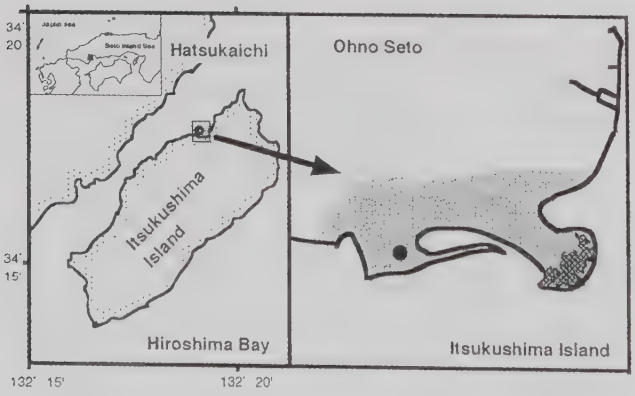


Fig. 1. Location of the sampling station in the tidal flat of Miyajima (Itsukushima Island) in Hiroshima Bay.

AVSは検知管法により, ILは乾燥した泥試料を550℃で６時間燃焼して測定した。クロロフィルaおよびフェオ色素は干潟の砂試料約 1gをジメチルホルムアミドに懸濁, 静置した後, 上澄みをTURNERの蛍光計（10-AU型）で測定した。また, 試料40～50gをふるい振とう機にかけて粒度組成を測り中央粒径値φを求めた。

結　　果

干潟環境　干潟の環境項目の測定結果をTable 1に示した。調査期間中の泥温は８月に30.2℃で最高となり, 12月に14.3℃で最低となった。干潟のAVSは４月, ５月, ８月には0.01mg/g dry sedimentを超えたものの, 他の月は検出されなかった。ILは４月が最も高く2.1%であったが, 徐々に減少し, 10月に1.0%で最低となった。クロロフィルaは８月に5.8mg/g dry sedimentで最も高く, ５月と10月に低かった。フェオ色素は８月に10.3mg/g dry sedimentで最高となり, 10月に4.0 mg/g dry sedimentで最低となった。クロロフィルaとフェオ色素の

Table 1. The values of environmental factors at each sampling month

	Sampling date in 1999				
	Apr.16	May13	Aug.11	Oct.12	Dec.6
Sediment temperature (℃)	16.9	24.0	30.2	25.2	14.3
AVS (mg/g dry sediment)	0.01	0.02	0.02	NS	NS
IL (%)	2.1	2.0	1.5	1.0	1.6
Chlorophyll-a (mg/g dry sediment)	3.4	1.4	5.8	2.5	4.8
Pheo-pigment (mg/g dry sediment)	8.5	7.8	10.3	4.0	6.0
Chlorophyll-a+Pheo (mg/g dry sediment)	11.9	9.2	16.1	6.5	10.8
Median diameter (φ50)	0.6	-0.5	0.1	-1.0	-0.9

AVS：Acid volatile sulphide IL：Ignition loss

合計値は春季～夏季にかけて高く8月に最高となり，10月に減少したが，12月には回復した。中央粒径値φは0.6～－1.0で粗い砂地であった。

生息密度の変化　干潟の主要なメイオベントス動物群の個体数組成の変化をFig. 2に示した。調査期間を通じて線虫類が優占し，4月の調査では92%に達した。その後線虫類の割合は徐々に低下し，10月の調査では48%を示し，代わってカイアシ類とノープリウス幼生を合わせた割合が40%に増加した。しかし，12月には線虫類の割合は82%にまで回復した。調査期間中の線虫類の個体数の平均割合は78%であった。各動物群の干潟における生息密度の変化をFig. 3に示した。線虫類の生息密度は4月に最も高く，2,620±888×10^3 indiv./m^2

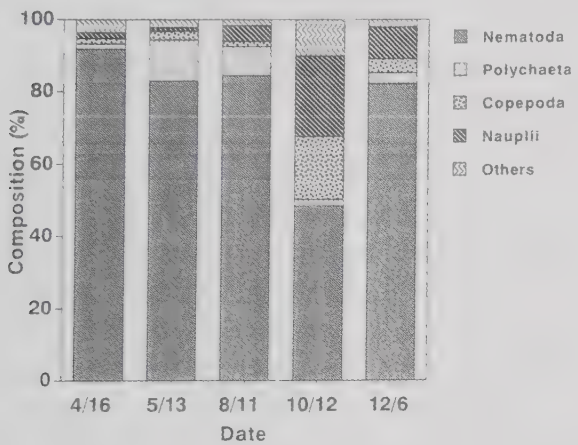


Fig. 2. Seasonal changes in the percentage composition of meiobenthic organisms in the tidal flat of Miyajima (Itsukushima Island) in Hiroshima Bay.

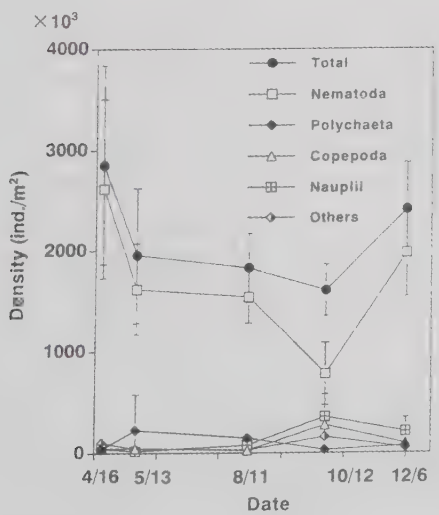


Fig. 3. Seasonal changes in the mean densities of meiobenthic organisms in the tidal flat of Miyajima (Itsukushima Island) in Hiroshima Bay.

であった。その後減少して10月には780±307×10^3 indiv./m^2で最低密度となったが，12月には再び増加した。カイアシ類は線虫類と逆の傾向を示し，4月，5月，8月は44±29～27±13×10^3 indiv./m^2で推移し低密度であったが，10月には218±114×10^3 indiv./m^2で最高密度を示した。カイアシ類等の幼生であるノープリウスはカイアシ類と全く同様の傾向を示し，10月に360±218×10^3 indiv./m^2で最高密度となった。多毛類は5月に226±352×10^3 indiv./m^2，8月に149±28×10^3 indiv./m^2でいずれも高密度であったが，5月には多毛類の幼生が個体数の80%を占めた。10月には71±9×10^3 indiv./m^2で最低密度を示した。

線虫類の乾燥重量と年間生産量の推定　宮島干潟の各調査月毎の線虫類1個体あたりの平均乾燥重量を算出し，その値を基に1平方メートルあたりの現存量を乾燥重量と炭素量で示した（Table 2）。1個体あたりの平均乾燥重量は0.32～0.82 μgで5月の最高値を除けば月別の差は小さかった。この値に生息密度を乗じて求めた各月の現存量は乾燥重量で0.28～1.33g dry wt./m^2，炭素量で0.08～0.40g C/m^2となり，4月，5月に高くなった。本調査期間中における現存量の平均は乾燥重量で0.82g dry wt./m^2，炭素量では0.25g C/m^2となった。これらの値を年平均と仮定し，各々に世代単位のP/B比3と年間世代数18を乗じて年間生産量を推定した。宮島干潟における線虫類の年間生産量は44.3g dry wt./m^2，13.5g C/m^2と推定された。

線虫類の属組成　最高密度を示した4月と最低密度を示した10月の線虫類の食性型に基づく属構成についてTable 3に示した。4月のサンプルでは27属，10月のサンプルでは22属がそれぞれ認められた。4月と10月に共通して出現した属は11属であった。4月の優占属は*Microlaimus*属で同定した線虫類個体数の27.3%を占

Table 2. Mean dry weight and biomass of Nematoda at each sampling month

Date	Mean dry wt./indiv.* (μg)	Biomass	
		g dry wt./m^2	gC/m^2
Apr.16	0.48	1.26	0.38
May.13	0.82	1.33	0.40
Aug.11	0.39	0.60	0.18
Oct.12	0.36	0.28	0.08
Dec.6	0.32	0.63	0.19
Annual mean	0.47	0.82	0.25

* Mean of 250～300 individuals

Table 3. Composition of the Nematoda genera based on their feeding types

Feeding type Genus	Apr.16		Oct.12	
	No.of indiv.	%	No.of indiv.	%
Selective Deposit feeder(1A)	31	14.1	7	3.8
Halalaimus	26		7	
Nemanema	1			
Platycoma	4			
Non-selective Deposit feeder(1B)	45	20.5	56	30.4
Anoplostoma	3		6	
Axonolaimus	12			
Aegialoalaimus	1			
Daptonema	2		18	
Gnomoxyala	6			
Metalinhomoeus	16			
Monhysteridae			32	
Parodontophora	5			
Epigrowth feeder(2A)	126	57.2	76	41.3
Atchromadora			1	
Camacolaimus	5		1	
Chromadora	13		20	
Chromadorella	1		4	
Chromadorina			2	
Chromadorita			19	
Desmodora	4		1	
Desmolaimus	3			
Eurystomina	4			
Leptolaimus			1	
Microlaimus	60		3	
Molgolaimus	2		21	
Onchium			1	
Oncholaimellus	1			
Pareurystomina	3			
Rhynchonema	1			
Synonchus	7			
Spirinia	22		2	
Omnivore/predators(2B)	16	7.3	26	14.1
Enoploaimus			24	
Halichoanolaimus	2			
Viscosia	11		2	
Vasostoma	3			
Unidentification	2	0.9	19	10.3
Total	220	100	184	100

めた。次いで*Halalaimus*属が多く出現した。10月の優占属はMonhysteridae科の属で17.3%出現した。線虫類の口形から分けた4つの食性型1A: selecvtive deposit feeder, 1B: non-selecvtive deposit feeder, 2A: epigrowth feeder, 2B: omnivore/predator分類では(Wieser, 1953), 4月のサンプルは1A: 14.1%, 1B: 20.5%, 2A: 57.2%, 2B: 7.3%, 10月は1A: 7.8%, 1B: 30.4%, 2A: 41.3%, 2B: 14.1%の食性構成となった。両月ともにEpigrowth feeder (2A) が卓越したが, その割合は4月の方が高く, 10月にはnon-selecvtive deposit feeder (1B) の割合が4月に比べ高くなった。

考　察

宮島干潟におけるメイオベントスの生息密度は, 春に最も高くその後次第に減少し, 秋に最も低下した後, 冬に向かって増加に転じた。この季節的変動パターンはメイオベントス全体の78%を占める線虫類の密度変動と連動していた。一般的に干潟に生息する線虫類の生息密度は春季から夏季にかけて高く冬季に低い傾向

にある（Heip *et al.*, 1985）。線虫類は世代時間が短く年中繁殖が可能であり，1個体の線虫が長期にわたって産卵を続ける（辻野ら，1997）。水温が高くなると線虫類の成長は早くなり（Vranken *et al.*, 1988），産卵可能な個体数が増えるため，春から夏にかけて昇温に伴い線虫類の個体数は増加すると考えられる。底生性カイアシ類の現存量を左右する基本的な要因も水温であることから（Giere, 1993），線虫類と同様に水温の上昇とともにその生息密度は高くなると考えられる（Hicks and Coull, 1983）。しかし，高い現存量を維持するには餌料が必要であり，メイオベントスの現存量は底泥に蓄積された植物プランクトン由来のデトライタスの量に影響され，餌としてのデトライタスが豊富なときは水温の上昇とともに増加するが，デトライタスが枯渇すると減少することが示唆されている（Rudnick *et al.*, 1985）。

宮島干潟の底質は粒度組成の中央粒径値ϕが0.6～－1.0の粗い砂質で，強熱減量は4月に，植物色素量（クロロフィルaとフェオ色素）は4月と8月に高く，いずれも10月に最低値を示し，4月の値の約1/2であった。強熱減量は有機物量の指標，植物色素量は付着珪藻とその死骸および浮遊性植物プランクトンの死骸等の総量の指標であり，強熱減量と植物色素量は宮島干潟に生息している線虫類の餌量の指標と考えられる。

宮島干潟に生息する線虫類の4月と10月の出現属から食性を調べた結果，出現属のほとんどは，付着珪藻や細菌をかきとって食べるEpigrowth feeder（2A）と，デトライタスなどの有機物を非選択的に吸って食べるnon-selective deposit feeder（1B）に分類された。すなわち，これらの線虫類の餌は，一つは干潟の砂粒表面に増殖する細菌や付着珪藻，もう一つは付着珪藻の死骸やその他の細かな有機物からなるデトライタスであると考えられる。これらのことから線虫類の餌料は4月と8月に多く，10月に最も少なかったと考えられる。

メイオベントスの現存量を左右するその他の要因としては，干潟に生息するマクロベントスの活動による攪拌や捕食の影響が上げられる。この関係についてはマクロベントスの多毛類や二枚貝に関する研究があり，多毛類の捕食によって線虫類，カイアシ類ともに有意に減少すると報告されている（Tita *et al.*, 2000）。環境庁の調査（1993）によると，宮島干潟におけるマクロベントスの年平均生息密度は6,400indiv./m^{2}で，そのうち多毛類が最も多く，次いで二枚貝のアサリ等が多く出現する。したがって，本干潟におけるメイオベントスにとって必要な餌料が満たされていたとすれば，春から夏にかけて高水温にかかわらずメイオベントスが減少した要因として，マクロベントスによる捕食の影響を考慮する必要がある。

宮島干潟における線虫類の現存量は密度と同様に4月，5月に高く，夏から秋にかけて低下する傾向を示した。平均現存量は0.82g dry wt./m^2，炭素量に換算すると0.25g C/m^{2}であった。平川ら（1988）が三河湾の砂泥干潟で測定した線虫類の現存量は1.07g dry wt./m^2，0.38g C/m^2，Witte and Zijlstra（1984）のWadden SeaにおけるBalgzandの干潟（砂質）調査における線虫類現存量は0.6g dry wt./m^{2}であることから，宮島干潟の線虫類現存量はこれらの干潟域と同程度と考えられる。また，線虫類はメイオベントス年間平均個体数の78%を占めること，線虫類以外のメイオベントス動物群の乾重量は線虫類よりも大きい（Sirayama, 1983）ことから，宮島干潟のメイオベントス現存量は少なくとも約1.05g dry wt./m^{2}と見積もられた。環境庁の調査（1993）によると宮島干潟におけるマクロベントスの年間平均現存量は820g wet wt./m^{2}であり，そのほとんどは二枚貝で占められている。乾燥重量は殻等を持たない多毛類や甲殻類では湿重量の20%，軟体類のように石灰質を持つものでは36～39%であるが（玉井，1988），仮に20%とすると乾重量は約164g dry wt./m^{2}となり，メイオベントスの現存量はマクロベントスの約0.6%と推定された。

本調査干潟における線虫類の年間生産量は，年間世代数18を用いて計算し，44.3g dry wt./m^2，炭素量で13.5g C/m^{2}と算出した。この年間世代数は，1 mm前後の線虫類の世代時間が水温20℃では10～20日前後であること（辻野ら，1997），調査期間中の干潟泥温が14～30℃で，年平均泥温は20℃よりもやや低めと推定されることから，線虫類の平均世代時間を20℃における長めの世代時間20日として求めたものである。少なくとも従来よく用いられていた年間世代数3（Gerlach, 1971）では明らかに過小評価であると考えた。この値を基に現存量と同様にメイオベントスの生産量を推定すると56.8g dry wt./m^{2}となる。宮島干潟のマクロベントス生産量を，マクロベントスの現存量にマクロベントスの現存量と生産量の平均的な比率3（玉井，1989）を乗じて求めると，492g dry wt./m^{2}となり，宮島干潟のマクロベントスに対するメイオベントス生産量の割合は約11.5%と推定された。

このようにマクロベントス生産量に対するメイオベントス生産量の割合は，マクロベントス現存量に対するメイオベントス現存量の割合に比べ高い割合となる。この比率は底質環境によって変わり，泥質ではマクロベントスの現存量は低い傾向がある（Ankar and Elmgren, 1976）ため，場合によってはメイオベントスの生産量がマクロベントスの生産量を上回る可能性もある。干潟の機能が見直されている今，干潟の生産力の

高さにおけるメイオベントスの役割を評価するため，日本沿岸干潟域、特に泥質干潟におけるマクロベントスおよびメイオベントス調査が望まれる。

謝　辞

宮島干潟調査にあたりご協力いただいた，元宮島町商工会，濱岡寛次氏に深く感謝申し上げます。また，本文を校閲していただいた，赤潮環境部部長玉井恭一博士に厚くお礼申し上げます。

文　献

會澤安志，1988: 大海湾干潟域におけるメイオベントスの動態．潮間帯周辺海域における浄化能力と生物生産に関する研究．農林水産技術会議事務局，106-110.

Ankar S. and Elmgren S., 1976: The benthic macro- and meiofauna of the Asko-Landsort area (Northern Baltic proper). A stratified sampling survey. Contr. Asko Lab. Univ. Stockholm, **11**, 115.

Giere O., 1993: Meiobenthology, Springer-Verlag, Berlin, 328pp.

Gerlach S. A., 1971: On the importance of marine meiofauna for benthos communities. *Oecologia* (Berl.), **6**, 176-190.

Heip C., Vincx M.,and Vranken G., 1985: The ecology of marine nematodes. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.*, **23**, 399-489.

Hicks G. R. F. and Coull B. C., 1983: The ecology of marine meiobenthic harpacticoid copepods. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.*, **21**, 67-175.

平川和正，熊田 弘，1986: 1985年春季の三河湾干潟域におけるメイオベントスの分布性状．東海水研研報，**119**, 57-64.

平川和正，熊田 弘，佐々木克之，1988: 三河湾干潟域における自由生活線虫類の生産量推定．東海水研研報，**125**, 83-88.

板岡 睦，玉井恭一，1993: 広島湾におけるメイオベントス群集構造と富栄養化．日本ベントス学会誌，**45**, 19-28.

環境庁，1993: 瀬戸内海の環境構成要素としての干潟の保全に関する研究．平成４年度環境庁委託業務報告書，80p.

鬼頭研二，2000: 海浜域のメイオベントス．海洋，**32**(**10**), 665-670

Kuipers B. R., Wilde P.A.W.J. de, and Creutzberg F., 1981: Energy flow in a tidal flat ecosystem. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **5**, 215-221.

大野町，1989: 大野瀬戸水産資源量調査．昭和63年度報告書，1-94.

Rudnick D.T., Elmgren R., and Frithsen J. B., 1985: Meiofaunal prominence and benthic seasonality in a coastal marine ecosystem. *Oecologia*, **67**, 157-168.

酒井保次，1984: 浅海砂泥域におけるメイオベントスの定量的研究－瀬戸内海中，西部のメイオベントス現存量について．日本ベントス研究会誌，**27**, 14-21.

酒井保次，1985: 周防灘におけるメイオベントスの生態学的研究，南西水研研報，**19**, 53-85.

佐々木克之，1994: 内湾および干潟における物質循環と生物生産(8)．干潟域の物質循環．海洋と生物，**91**, 122-128.

Sirayama Y., 1983 : Size-structure of deep-sea meio- and macrobenthos in the Western Pacific. *Int. Rev. Ges. Hydrobio.*, **68**, 799-810.

玉井恭一，1988: ベントスの生産量とその推定法，③－生産量推定にかかわる諸項目．海洋と生物，**60**, 49-53.

玉井恭一，1989: ベントスの生産量とその推定法，⑤－便宜法による種個体群の生産量推定〔その1〕．海洋と生物，**62**, 217-221.

辻野 睦，玉井恭一，1996: 大阪湾の底質環境とメイオベントスの分布．南西水研研報．**29**, 87-100.

Tita G., Desrosiers G., Vincx M., and Nozais C., 2000: Predation and sediment disturbance effects of the intertidal polychaete *Nereis virens* (Sars) on associated meiofaunal assemblages. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **243**, 261-282.

辻野 睦，内田卓志，玉井恭一，1997: 海産自由生活性線虫類*Microlaimus* sp. (Chromadorida : Microlaimidae) の培養方法と生活史．*Benthos Res.*, **52**, 9-14.

辻野 睦，有馬郷司，神山孝史，内田卓志，2000: 呉湾のマクロベントス・メイオベントスと底質環境．瀬戸内水研研報，**2**, 49-56.

Vranken G. P. and Heip C., 1986: The productivity of marine nematodes. *Ophelia*, **26**, 429-442.

Vranken G. P., Herman M. J., and Heip C., 1988: Studies of the life-history and energetics of marine and brackish-water nematodes. I . Demography of *Monhystera disjuncta* at different

temperature and feeding conditions. *Oecologia*, **77**, 296-301.

Warwick R. M. and Price R., 1979: Ecological and metabolic studies on free-living neamtodes from an estuarine mud-flat. *Estuar. Coast. Mar. Sci.*, **9**, 257-271.

Witte J. I. J. and Zijlstra J. J., 1984: The meiofauna of a tidal flat in the western part of the Wadden Sea and its role in the benthic ecosystem. *Mar.Ecol. Prog. Ser.*, **14**, 129-138.

Wieser W., 1953: Die beziehungen zwischen mundhöhlengestalt ernährungsweise und Vorkommen bei freilebenden marinen nematoden. *Arkiv zoologi* (Ser.2), **4**, 439-484.

山西良平, 1979: かきまぜ法によるメイオベントス抽出効率. ベントス研会誌, **17/18**, 52-58.

水研センター研報，第4号，40－104，平成14年
Bull. Fish. Res. Agen., No. 4, 40-104, 2002

博士号論文

遺伝資源としてのマガキ*Crassostrea gigas*の特性評価と保存に関する研究[*1]

薄　浩則[*2]

Evaluation of characteristics and preservation of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in view of the genetic resources[*1]

Hironori USUKI[*2]

Abstract Differences in characteristics among local populations of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in Japan, evaluation of several characteristics in their genetics and environments, estimation of heritability for improvement of economic traits, and preservation of sperm and larvae were studied on the basis of genetic resources.

Growth, mortality and other characteristics of local populations (Hiroshima, Miyagi, Ariake and Goto) were evaluated in parental and progeny groups cultured in Hiroshima Bay. For both generations, the Miyagi population grew fastest and the Ariake and Goto populations grew slower. Though the mortality was not significantly different for progeny cultured in pocket mesh bags, the progeny from Goto showed significantly higher mortality among progenies cultured by the collector method. Progeny from Ariake showed significantly lower mortality among the other progenies when cultured in narrow (10 mm) opening mesh bags and is thought to be the most tolerant to deterioration of living environment. Progeny of the Ariake population also had a spiny projection on their valves and showed a higher biomass rate (volume after narcotization/volume before narcotization).

Heritabilities for growth and survival of larvae and adult *C. gigas* were estimated by nested design (3 male×5 female). The heritability for survival rate ($h^2_{s+d} = 0.85$) between May and October of one-year-old oysters was larger than that for whole weight in October ($h^2_{s+d} \leqq 0.4$). Selection for improvement of survival was thought to be more effective than growth. No significant correlations in growth and survival between larvae and adults suggested that selection of larvae must be ineffective.

To estimate the influence of differences of spat locality and of culturing spot to characters of oyster, spats of Miyagi and Hiroshima populations were cultured simultaneously at four spots in Hiroshima Bay and three-way ANOVA were performed.

Though spat locality and culturing spot both significantly influenced many characters, shell width/shell length, density of shell, water content of flesh and water content of shell were not influenced by spat locality. Color of the mantle edge and internal shell cavity rate were influenced by spat locality more intensely than culturing spot, then, shell width/shell length and water content of flesh were influenced by spot more intensely than locality. Intensities of influence of interactions between locality and spot were obviously

2002年7月22日受理（Received on July 22, 2002）
水産総合研究センター業績 A 第26号（Contribution No. A 26 from the Fisheries Research Agency）
[*1] 東京大学審査学位論文（掲載するに際し投稿規程に沿って一部修正した）
[*2] 瀬戸内海区水産研究所　〒739-0452　広島県佐伯郡大野町丸石2-17-5 (National Research Institute of Fisheries and Environment of Inland Sea, 2-17-5 Maruishi, Ohno, Saeki, Hiroshima 739-0452, Japan).

different among characters of oysters.

RFLP analysis of calmodulin intron3 for oysters collected at shores in Ariake Bay aroused the suspicion of natural hybridization between spermatozoa of *C. gigas* and ova of *C. sikamea*. Artificial crossbreeding between *C. gigas* and *C. sikamea* discriminated by RFLP of 16SrRNA gene revealed that the same type of calmodulin intron3 as oysters collected in Ariake bay could yield in spats. Moreover, 0.6～5.7% of ova of *C. gigas* inseminated by spermatozoa of *C. sikamea* had developed and a few spats had set.

To determine an effective method for the cryopreservation of *C. gigas* sperm and larvae, diluents containing cryoprotectants, cooling methods and developmental stages were tested. For the sperm, the combination of a diluent containing 8% (v/v) dimethyl sulfoxide (DMSO), 50mM sucrose and 6mM reduced glutathione with cooling in liquid nitrogen vapor showed the highest relative larval yield (45.9%). Fertility with sperm cryopreserved at a concentration of 10^8 spermatozoa/200 μL was equivalent to that with fresh sperm when ova were inseminated in a concentration of 10^3 spermatozoa per ovum. Although spermatozoa cryopreserved for 4 years showed lower viability (40.3～53.3%) than the short-term cryopreserved spermatozoa (60～70%), the ratio of normal D-shaped larvae and survival rate at 6 days after fertilization were 78.0 and 77.4%, respectively.

For the larvae, using 1/4 concentration seawater containing 1.0M DMSO and 250mM trehalose as the cryopreservative suspension, and cooling to −35℃ at −1℃/min and kept at this temperature for 5 min before plunging into liquid nitrogen, a oyster spat could yield from cryopreserved trochophore larvae (just before making shell gland) after 8 months of cyopreservation. This indicates that it is possible to establish cryopreservation of the Pacific oyster larvae by further improving the technique.

Key words: Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, Genetics, Heritability, Cryopreservation

目　　次

緒　言
第1章　地方集団間の特性比較
　1－1　マガキ各地方集団の広島湾での養成における諸形質
　1－2　形質に及ぼす産地の差と養成水域の差の影響
第2章　近縁種との交配特性
　2－1　DNA解析によるシカメの確認
　2－2　mtシカメ型カキとマガキの交配
第3章　遺伝率の推定
　3－1　有明産および広島産を用いた枝分かれ交配
第4章　精子と幼生の凍結保存
　4－1　精子の凍結保存
　4－2　幼生の凍結保存
第5章　総合考察
第6章　要約
謝　辞
参考文献

縄文時代の貝塚から数多くのカキ殻が見つかることからも明らかなように，カキは採集が容易で栄養価が高いことなどで古来貴重な海の幸として人類と深い関係を持ってきた。当時は，海岸の岩場や礫に付着した天然のカキを干潮時に採取するなどして利用していたものと思われる。

沿岸性のカキ類の利用方法がこのような単に採取する時代から人間の手で増殖や養殖する時代にどのように移行していったのか，その歴史は充分に明らかにされていないが，古代ローマでは欧州の在来種ヨーロッパヒラガキ*Ostrea edulis*を蓄養する池を築いたり，木製の構造物（fascines）を沿岸に設置して稚貝の付着を促進する試みなどがすでに行われていたといわれる。中世からルネッサンス時代にかけてのヨーロッパではカキ礁での漁獲が盛んになったが，18世紀には人口の増加に起因する乱獲が資源の枯渇を招いた（Héral *et al.*, 1990）。これをうけて1860年代以降には付着器（cultch）による天然採苗が始まり，また，採苗した種苗を地蒔き式や棚式で養殖するなど，人間が積極的にカキの生産を管理するようになった。

我が国では，文献上の記載では天文年間（1532～55）に安芸の国（現在の広島県）で，具体的な方式は知られていないがカキの養殖法が発明されたとされ，寛永年間（1624～1644）には石蒔養殖が行われた記録がある。その後，竹簀を沿岸に設置して稚貝の付着を促進し，これらの稚貝を主に地蒔きをする方式でカキ養殖が始まったとされている。以来，技術的な改良が図られ，現在では垂下養殖法や延縄養殖法により海域を立体的に利用する一大養殖産業に発達した。

マガキなど多くの浅海性二枚貝類は，鰓の繊毛運動で水流を起こすことにより水中の植物プランクトンなどを濾過して餌料としている。そのため天然海域で無給餌による養殖が可能であることから早くから養殖生産が実施されてきた。また，カキ類は北緯64度～南緯44度にわたる世界の沿岸域から河口域に広く生息しているといわれるが（Hedgecock, 1995），その中でもマガキは特に強い繁殖力と広い環境適応性を持ち，世界各地で養殖されるようになった。

FAOの1997年現在の統計では，アメリカガキ*Crassostrea virginica*やヨーロッパヒラガキなどを含めた全世界の主要なカキ類の総生産量は殻付き換算で約328万トンであり，これは貝類の中ではもっとも多く，ホタテ・イタヤガイ類やイガイ類のほぼ2倍，アワビ類のほぼ30倍に相当し，イカ類の漁獲量に匹敵する。アメリカでは水揚げ高の第2位に位置する重要魚介類となっている。

生産量を国別に見ると中国が圧倒的な割合を占め，全世界のカキ生産量の約72%（約228万トン）を産出している。このうち半数以上はマガキの近縁種と思われるZhe oyster *Crassostrea plicatula* Gmelinが占め，マガキは中国のカキ生産量全体の10～20%と推測されている（Guo *et al.*, 1999）。世界のカキ類生産量の25%は日本，韓国，アメリカ，フランス，メキシコの5カ国が占め，日本は全世界の6.6%（約22万トン）のカキを生産している。これら主要なカキの生産国のうち，メキシコ以外の国では多少ともマガキが生産されている。アメリカ，フランス，中国などは広大な沿岸域を有し，地理的・生態的にも多様なことから，あるいはまた過去に在来種以外のカキを導入して養殖したなど歴史的経緯もあって，複数種のカキが養殖されている。

日本では近年山陰地方を中心にイワガキ*Crassostrea nipponа*が小規模に養殖されるようになってきたが，養殖カキの殆どはなおマガキ*Crassostrea gigas*一種で占められている。

マガキは1793年にスウェーデンの博物学者ツュンベリー（Carl Peter Thunberg）によりOstrea *gigas*の学名で初めて種として記載され，その後も海外の研究者によって分類学的な検討が行われた。国内でも脇谷（1910）; Hirase（1930）; 岩川（1919）; 滝（1933）らによる日本産カキ類の分類学的検討のなかで扱われてきた。この頃の分類学的検討は主に貝殻の外部形態によるところが大きかったが，カキ類は生息環境により殻の外部形態が著しく変異するため，産地を異にするカキどうしをそのまま比較することにより多くの混乱が生じ，北海道，東北地方のものを*C. gigas*（ナガガキ，エゾガキ），東京湾以西のものを*C. laperousi*（マガキ），有明海産のものを*C. gigas* var. *sikamea*（シカメ）とし，各々別種あるいは変種として扱われたことがあった。その後，Imai and Sakai（1961）は北海道，宮城，広島，熊本等の地方集団から選んだ個体の純系交配および交雑を行ってそれらを各地で養成した。その結果，これらの地方集団はそれぞれ遺伝的に異なった生理・生態的特性を持つが，その変異はいずれも地理的分布と一致してある勾配をもって異なり，同一種マガキ*C. gigas*の地理的変異（地方品種）であると結論した。

その一方で沼知（1958, 1978）は有明海のマガキには各地方集団のマガキと交配しない雄をもつ型（A型）と完全に交配しあう型（B型）の2型が存在することを見出し，これらは殻の形態からは識別できないが，型ごとに集落をなして有明海一円に生息しているとした。さらに，1940年代に宮城および熊本県から米国へ輸出されたカキに混入していた，マガキとは成長速度等が異なる小型のカキが米国でKumamoto Oysterとして現在でも系統保存されていて，これについてHedgecock *et al.*（1993）によるアイソザイム型の研究や，Banks *et al.*（1993）によるDNA分析がなされてきた。それらの結果に基づき，今日Kumamoto oysterと呼ばれているカキは，かつて沼知（1971）が指摘したA型のマガキとともに，Amemiya（1928）が記載したシカメ（*C. gigas* var. *sikamea*）に相当すると見なされている（Banks *et al.*, 1994）。さらには，Ahmed（1975）は日本産マガキの分類に関する過去の研究やマガキの染色体構造に関する自らの研究の結果から，北海道産と宮城産のマガキを*C. gigas*，広島産のマガキを*C. laperousi*，熊本産のマガキを*C. sikamea*として各々別種として区別することを提案した。

このような現状のなか，有明海以外のマガキについてはそれぞれがマガキ単一種の地方集団とするのが今日の一般的見解である。

昭和初期に採苗器の垂下による天然採苗技術が確立（小笠原, 1959）し，さらに小笠原ら（1962）や小金沢（1978）の研究を経て天然種苗の利用技術が定着した現在，日本のマガキ養殖ではほぼ全ての種苗が天然採苗に依存していて，種ガキ生産は身ガキ生産とともにカ

キ養殖産業のもう一つの柱となっている。年により各産地で採苗やその後の種苗の生残が思わしくない場合があるが，国内全域にわたって養殖用の種苗が不足することは殆ど無い。これらの状況を維持してゆくためには親貝の成熟・産卵，幼生の発生そして稚貝の着底・成長など，天然集団のライフサイクルが正常に進行する沿岸生態系を将来にわたって保全してゆくことが基本的に重要である。

瀬戸内海域のマガキ養殖過程では採苗は養殖海域周辺で行われ，基本的に同一の地方集団が継続して養殖に利用されている。しかし，採苗期における台風襲来による幼生の逸散や着底期幼生の出現数が少ないなどが原因で必要種苗数が得られない場合，他海域から時として相当量の種苗が移入される。これにより予想される遺伝的な混合・撹乱は将来の育種や遺伝資源の保存にとっても大きな危惧であり，その実態や天然集団の再生産に与える影響を予測し，適切な養殖過程や保全計画を考える必要があるが，その基礎としてまず各海域の天然集団の形質の差を知る必要がある。

一方で，成長や身入りなど市場価値を決定する経済形質あるいは病気や環境に対する耐性を持ったカキを得るための一手法として，天然集団を素材とした選抜や交雑などによる育種をすすめてゆくことも将来必要にとなると考えられる。マガキは切開法により容易に人工受精が行える二枚貝であり，Hori and Kusakabe (1926)により幼生飼育が試みられて以来，飼育方法の改良や好適餌料の選定がなされた結果，人工種苗生産技術は現在では他の二枚貝類に比較して安定したものとなっていて，育種に必要な技術的要件を満たしている。一般的に，選抜による品種改良では目的とする形質について遺伝率を推定することが選抜効果の予測に役立つとされ（Falconer, 1989），マガキでもLannan (1972)やHedgecock *et al.* (1993)などによりいくつかの形質に関する推定例がある。また，交雑による品種改良を実行するには近縁種との交配特性を知る必要があり，アメリカガキではマガキとの交雑が試みられた例もある(Downing, 1991)。これらの実行に関しても，その基礎として，遺伝資源としての天然集団の形質の差を知る必要がある。また，近縁種との交配特性等を明らかにすることは交雑育種を実施する上で必要であるだけでなく，交雑可能な近縁種どうしが同所的に生息している海域での遺伝資源の動態の解明といった生態的な視点からも要求される。

成長，斃死，その他の形質に違いがあるマガキの各地方集団の保存を考えた場合，状況が許すのであれば，本来の生息海域での再生産を維持するのが望ましいことは言うまでもない。しかし，現在国内に生息する他の二枚貝類に目を向けると，ビョウブガイ，ハイガイ，ヌマコダキガイ，アゲマキガイ，ヒレナシジャコガイなど一部の野生集団が存亡の危機に立たされていて((社）日本水産資源保護協会, 1995)，歴史的に見れば国外のカキ類の集団が乱獲や疾病などで全滅に近い状態に至った例もある（Bodoy, 1993)。さらに近年は大規模な干拓などの人為的環境改変や二枚貝類を殺傷する植物プランクトン*Heterocapsa circularisquama*による赤潮の形成なども加わり，天然のマガキ地方集団の安定的な存続は決して約束されたものであるとは言えない。

集団内の遺伝的多様性を完全に保持したまま本来の生息環境外で遺伝資源を長期的に保存することは殆ど不可能であるが，凍結保存技術により最低限の遺伝資源を長期的に保存できる可能性はある。また，育種により作出した系統を保存するためにも配偶子や幼生の凍結保存は有用な手段と考えられる。さらに，発生能を保持したまま配偶子が凍結保存できれば，季節を問わず必要に応じて幼生を発生させて育種的研究やバイオアッセイに利用することなども可能である。

本研究は日本および諸外国のカキ養殖の最重要種であるマガキを中心に遺伝資源としての特性を評価するとともに，その保存方法を明らかにすることを目的とした。

第１章では，広島，宮城，有明，五島各地産のマガキを広島湾内で養成することにより，成長や斃死に関する特性を地方集団間で比較し，第２章ではマガキと，これに非常に近縁なカキであるシカメとの間の交配特性等を検討した。第３章ではマガキの選抜育種を目的として成長等に関する遺伝率の推定をした。さらに第４章では遺伝資源の保存方法として，マガキの精子および浮遊幼生の凍結保存方法の開発について検討した。

第１章　地方集団間の特性比較

1-1　マガキ各地方集団の広島湾での養成における諸形質

遺伝資源としてのマガキ地方集団を考えるとき，成長，斃死，殻の形態等の経済形質や産卵など再生産に関わる形質などが集団間でのどの程度の差があるかを知る必要がある。これらの形質は遺伝的要因に左右されていると同時に成育環境の影響も受けるので，異なる環境下で成育した地方集団をそのまま比較することはできない。

この研究では養成海域として広島湾を選択し，広島，宮城，有明，五島の各地方集団について各々の産地から入手した母貝集団（P_0）とこれから生産した次世代集団（P_1）の形質の特性を調査することを目的とした。

方 法

各産地から採集した天然母貝（P_0）およびこれらから人工種苗生産により作出した各地方集団第1代（P_1）を養成し，地方集団間の特性を比較した。

1）母貝集団（P_0）の入手と飼育

宮城産と広島産については，各々万石浦および大黒神島周辺海域で天然採苗した養殖用種苗を1992年5月に購入後，広島湾北部の大野瀬戸の潮間帯に設置した抑制棚に吊るし，潮汐の干満による干出にさらして成長を抑制しながら翌年1月まで養成した。有明産は1993年2月下旬に，長崎県北高来郡北高来町湯江地区の河口域の軟泥干潟中にカキ礁として形成された天然漁場で，五島産は同年同月に，長崎県の福江島西部荒川地区の河口域に形成された礫干潟で採集した(Fig. 1)。各地方集団の一部は母貝集団（P_0）として1993年2月または4月に真珠貝養殖用のポケットカゴ（85×45cm，6または7段）に1カゴあたり35個体，各地方品種あたり70～175個体収容し，翌年12月まで大野町地先で垂下養成した。これらについて殻高などの外部形態，全重量，斃死率等を連続測定した。

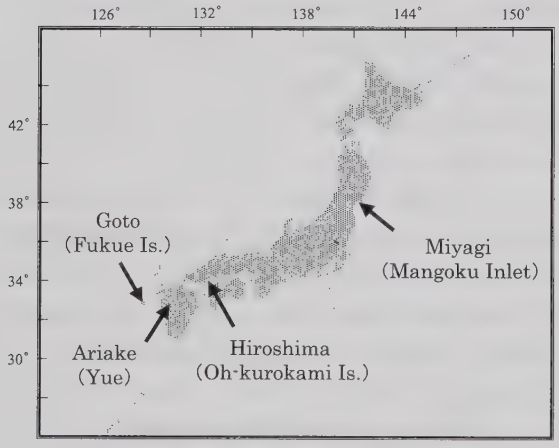


Fig. 1. Sampling points of local populations

2）各地方集団の次世代（P_1）の生産と飼育

1993年7月に上記母貝集団中の成熟した個体のなかから親貝として無作為に22～64個体（♂9～27個体，♀11～42個体）を選び切開法で人工授精を行った(Table 1)。採卵・採精には1～5mLの駒込ピペットを用い，親貝の外套膜の一部を切開してピペットの先端を表皮直下に挿入して採卵・採精し，個体ごとにビーカーに取った。その後，同一母貝集団の卵と精液を別々に混合して卵混合液と精液混合液を作り，海水中で両液を混合することにより受精させた後，洗卵した。受精時の卵と精液は同一地方集団内の同性個体間で同容量ずつ用いた。受精前に卵液の一部をとり，実体顕微鏡下で卵数を数えた。

洗卵後得られたD型幼生に人工培養した*Pavlova* sp. および*Chaetoceros* sp. を餌料として与え，100Lアルテミアふ化水槽中で各集団ごとに着底期まで飼育した。D型幼生の初期収容密度は7.5個/mLとし，2日に一度の全換水を基本とした。受精16～17日後にホタテ貝の貝殻を付着用コレクターとして各水槽中に垂下して幼生を付着させ，水槽中の幼生量がコレクター投入時の3%以下になった時点で付着終了とした。天然海域のマガキ幼生の付着を避けるため，これらの稚貝はその年の11月まで*Pavlova* sp.，*Chaetoceros* sp.および*Tetraselmis* sp.を餌料として室内で飼育し，その後大野町地先海域の筏で垂下養成した。人工受精，幼生飼育および稚貝の室内飼育時には砂濾過海水をさらに1μmカートリッジフィルターで濾過した海水を用いた。

翌年2月に稚貝をコレクターから分離し，稚貝の殻の表面にマーカーペンで番号を記した上から瞬間接着剤で被覆することにより個体ごとに標識を施した。これらの稚貝を殻の成長に合わせて5mm目ザブトンカゴ，10mm目ザブトンカゴ（16個体／カゴ）または20mm目ポケットカゴ（24個体／カゴ）に，各地方品種あたり87～194個体収容して養成し（Fig. 2），親貝同様に殻高，全重量，斃死率等を連続測定した。また，一部の個体については成長後も20mm目ポケットカゴには収容せず，継続して10mm目ザブトンカゴで養成した。これらとは別に，各地方集団あたり75～143個体の稚貝をホタテガイ貝殻に付着させて養成した。

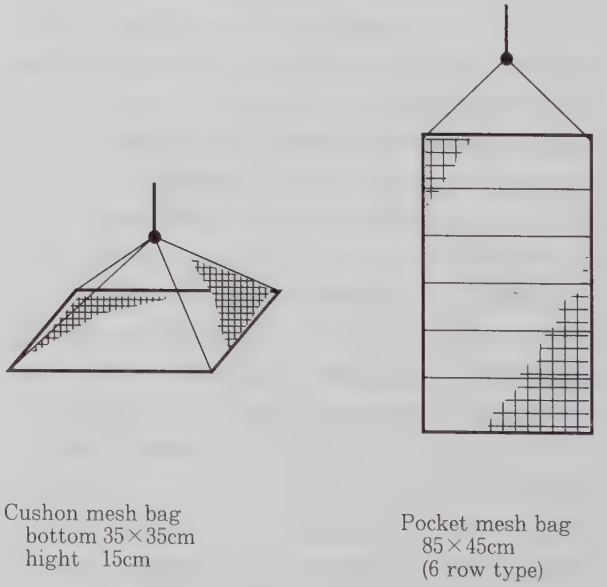


Fig. 2. Mesh bags used for experimental culture

3）バイオマス比

産卵やその後の身入りに対応した軟体部容積の変動を個体ごとに経時的に追跡することを目的に，個体の全容積に対する開殻時容積の割合を求めた。ここではこの値を「バイオマス比」と呼ぶことにする（Fig. 3）。カキを殺さずに開殻させるため，蒸留水で1/2に希釈した砂濾過海水に5～7%の塩化マグネシウム（六水和物）を加えて麻酔剤として用いた。予め12時間前後室内で干出させたカキをこの麻酔剤に4～12時間浸漬させることにより開殻させ，カキを軽く振ることにより内部の水分を取り除いた後，開殻時の容積を排水量で測定した。測定後は砂濾過海水の流水中へ収容することにより麻酔状態から回復させた。麻酔処理の有無の影響を調べるため，宮城産については麻酔処理を施さないコントロール区を設けた。

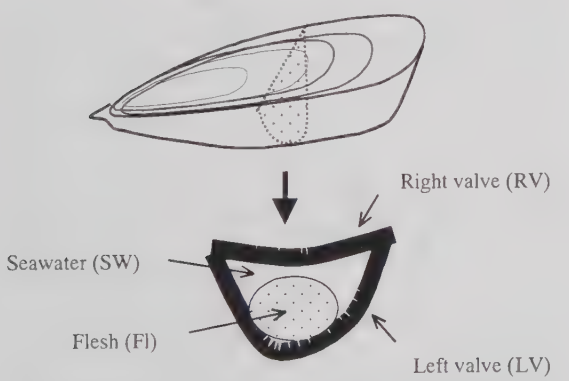
地方集団間の平均値の差の検定はシェッフェの全群比較法により行い，斃死率の差の検定は各集団の生死数を用いてTurkey法により行った。

4）間接濾過速度

濾過摂食者であるマガキの成長と関係すると考えられる餌料の濾過速度を間接法により測定し，地方集団間で比較した。マガキ1個体を濾過海水を満たした8L容のガラスビンに入れ，餌料として与えた*Pavlova* sp.の量をマルチサイザーII型（コールター社製）で経時的に測定後，下式により濾過水量を計算した。各地方集団とも5個体について実施した。

$$m = \ln(C_0 / C_t)\, M / t$$

C_0；粒子の初期濃度（cell/mL）
C_t；粒子の最終濃度（cell/mL）
t；経過時間（min）
M；全水量（mL）
m；濾過水量（mL/min）



Volume before narcotization (Vb)＝RV+LV+F1
Volume after narcotization (Va)＝Vb－SW
Biomass rate＝Va÷Vb

Fig. 3. Conceptual diagram of biomass rate

結　果

1）母貝集団P_0

1993年4月～12月の8ヵ月間の全重量の増加率（(翌月値－当月値）／日数／当月値）は，宮城産と広島産に比較して有明産と五島産は低い値を示した（Fig. 4）。特に有明産のカキは養成期間内に殻高が殆ど増加しなかった（Fig. 5）。

Fig. 6に示すとおり，各地方集団とも8～10月の間に顕著な斃死がみられたが，10月以降の斃死は僅かであった。斃死率の増加がほぼ停止した10月5日時点での斃死率は五島産がもっとも高く，もっとも低い有明産のほぼ2倍に達した。また，この時点での生死数の差の検定結果では，高斃死率の五島・宮城産，低斃死率の広島・有明産の2群に別れた（Table 1）。

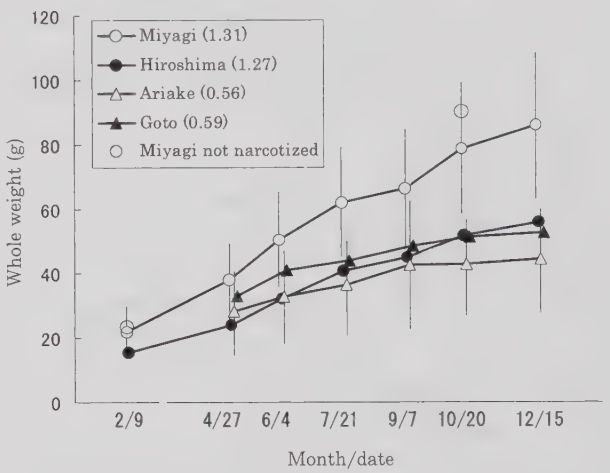


Fig. 4. Whole weight of parental groups. Numbers in parencies after local name indicate growth rates (Apr to Dec). Vertical bars added to symbols of Miyagi and Ariake denote ±S.E. Symbols out of lines denote values of collector culture method.

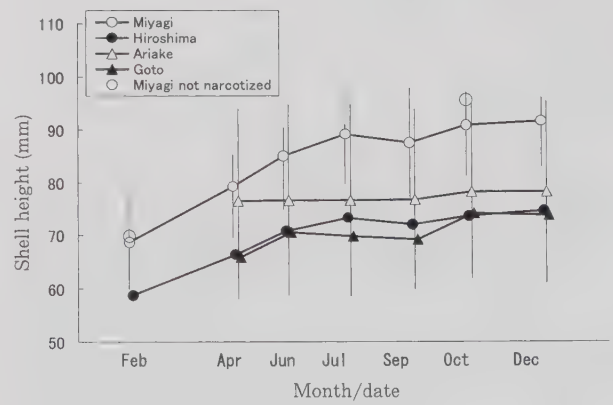


Fig. 5. Shell height of parental groups. Vertical bars added above and under symbols of Miyagi and Ariake denote ±S.E.

麻酔後のカキの容積は，殻容積と軟体部容積の和と高い相関を示し（Fig. 7），また，バイオマス比は軟体部容積／殻内容積の値とも明らかな相関を示した（Fig. 8）。バイオマス比の平均値の変動は地方集団間で異なり，宮城産と五島産は4月から6月にかけて広島産や有明産よりも顕著な増加がみられた。さらに，有明産以外の値は6月から9月の産卵期にかけて減少しその後の身入り期には増加したのに対し，有明産の値は10月まで若干の増加傾向を示した後12月に減少した（Fig. 9）。個体ごとのバイオマス比の変動と斃死期の生死に関し，斃死期に死亡した個体で産卵期のバイオマス比が急激に減少しているなどの明らかな対応関係はみられなかった（Fig. 10）。

Table 1. Production of progeny of each local population

		Miyagi	Hiroshima	Ariake	Goto
Date of insemination		21-Jul	20-Jul	16-Jul	15-Jul
Number of parents	♂	27	11	9	19
	♀	37	11	35	42
Number of ova($\times 10^4$)		4590	678	1560	2442
Percent ova developed		61%	52%	65%	54%
D-shaped larval ratio		62%	54%	41%	37%
Spats yielded		1111	723	891	1062

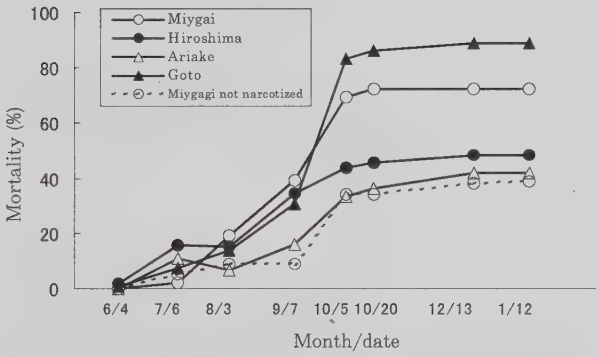


Fig. 6. Mortality of parental groups

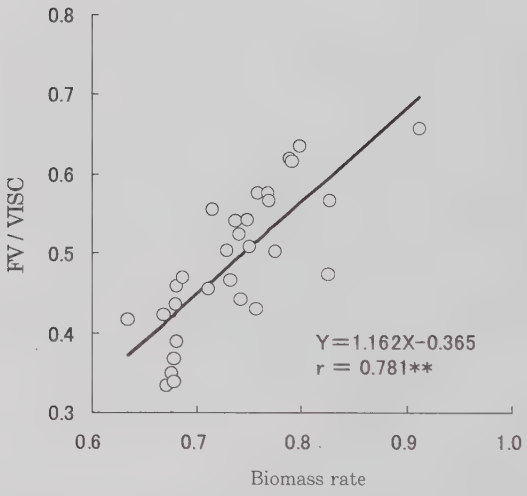


Fig. 8. Relationship between Biomass rate and FV/VISC. Parental group from Miyagi, July. FV; flesh volume VISC; volume of internal shell cavity.

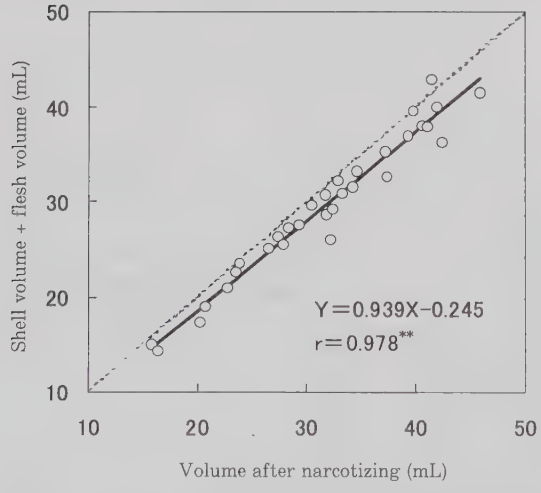


Fig. 7. Relationship between the volume after narcotizing and the sum of shell volume and flesh volume. Parental group of Miyagi, July

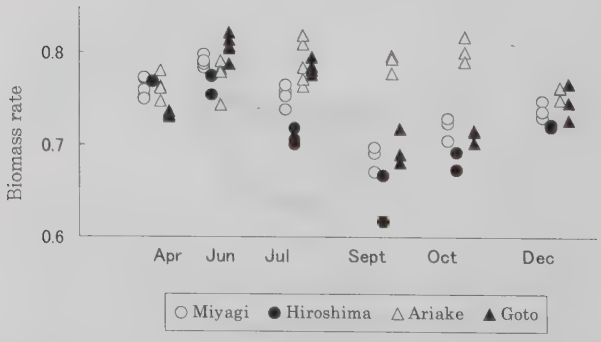


Fig. 9. Biomass ratio of parental groups. Each symbol denotes the mean value for one mesh bag.

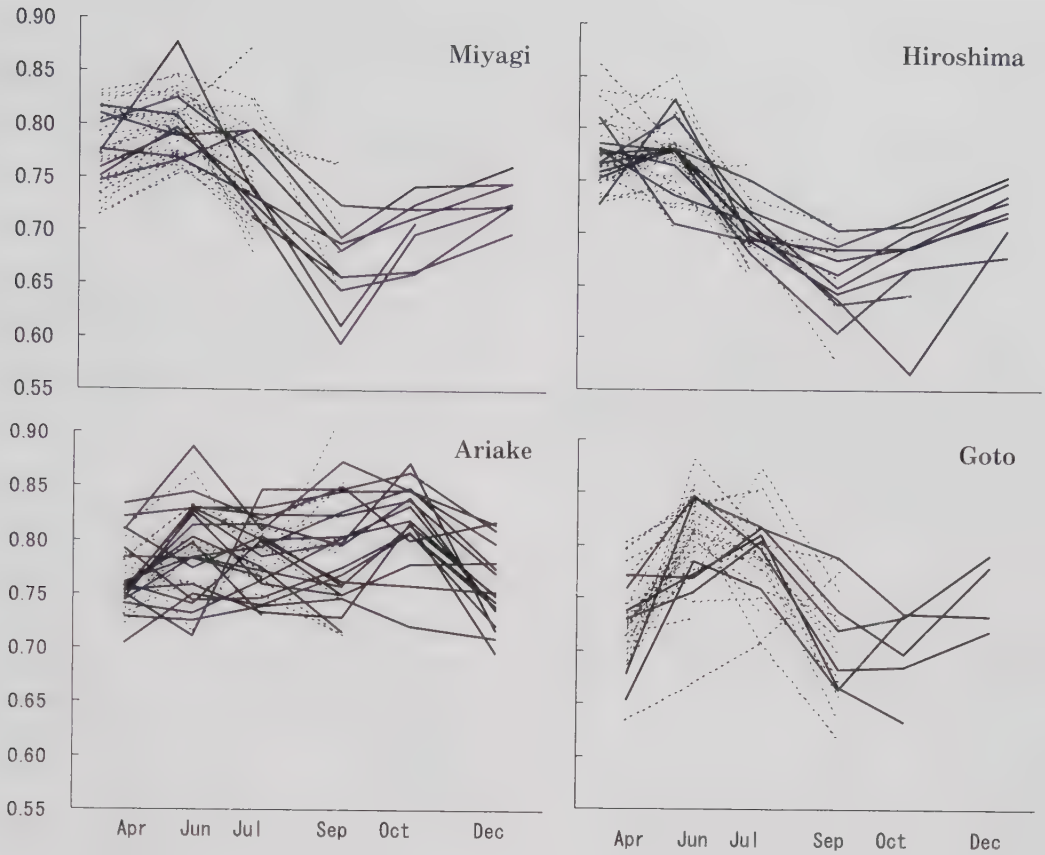


Fig. 10. Biomass rate of parental groups (individual). Broken lines denote individuals which died before October.

2）次世代集団P_1

全重量の比較では，宮城産および広島産は有明産および五島産より成長が速い傾向にあった（Fig. 11）。この傾向はコレクターに付着させて養成したカキでも同様であった。1月下旬での全重量（ポケットカゴ養成）の差の検定では，宮城産＞広島産＞有明・五島産，の順に高い値を示した。

有明産のカキから作出した稚貝は他産地と較べ殻表に棘状の突起や襞を持つ個体が多く観察され，3～6月には殻幅殻長比が急激に増加し（Fig. 12），6月には他の全ての産地よりも1％以下の水準で有意に大きな値を示すようになった（Table 2）。一方，広島産と宮城産の殻幅殻長比の差は，他産地間の組み合わせに比べると不明確だった。

採苗翌年6～10月の斃死期に，五島産はポケットカゴ養成でもっとも高い斃死率を示し，コレクター養成では他のどの産地との比較でも5％以下の水準で有意に高い斃死率を示した。全体的には目合いが小さいザブトンカゴでの養成は目合いの大きいポケットカゴより高い斃死率を示すが，有明産は目合いの小さいザブトンカゴで他の全ての産地との比較で1％以下の水準で有意に低い斃死率を示した（Fig. 13）。

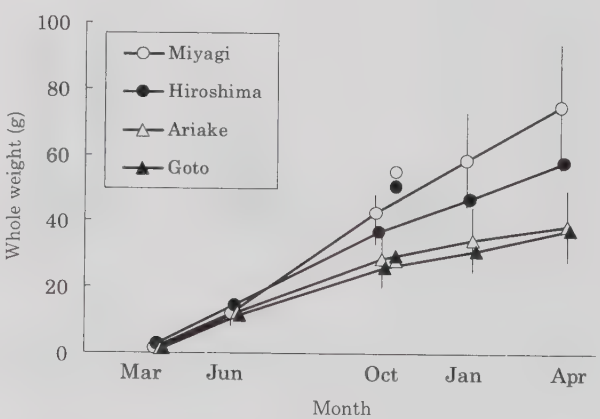


Fig. 11. Whole weight of progeny groups. (pocket mesh bags culture). Vertical bars added to symbols of Miyagi and Ariake denote ±S.E. Symbols out of lines denote values of collector culture method.

有明産P_1のバイオマス比の平均値は有明産母貝集団と比較すると他産地に近い変動を示し（Fig. 14），ポケットカゴ養成では広島産との間でだけ常に1%以下の水準で有意差があったが，五島産との間には5％の水

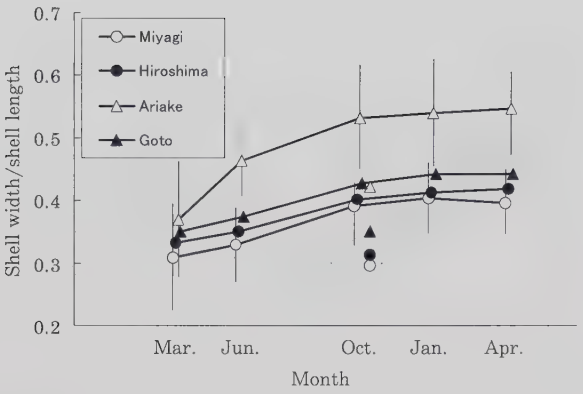


Fig. 12. SW/SL of progeny groups (pocket mesh bags culture). Vertical bars added to symbols of Miyagi and Ariake denote ±S.E. Symbols out of lines denote values of collector culture method.

Table 2. Differences in SW/SL among progeny groups (pocket mesh bags culture)

Groups	Mar	Jun	Oct	Jan	Apr
Hiroshina-Miyagi	—	*	—	—	*
Hiroshima-Ariake	**	**	**	**	**
Hiroshima-goto	—	*	*	**	*
Miyagi-Ariake	**	**	**	**	**
Miyagi-Goto	**	**	**	**	**
Ariake-Goto	*	**	**	**	**

** ; Significant at 1% level, * ; Significant at 5 % level

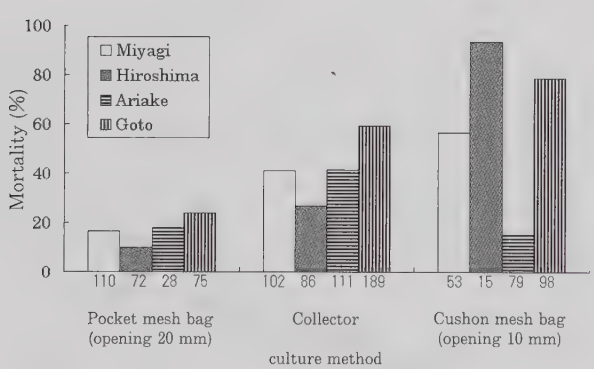


Fig. 13. Mortali t y of progeny groups. (June to October). The number of individuals in each group is shown under the bar.

準でも終始有意差は無かった（Table 3)。また，有明産母貝集団は10～12月にかけて他産地と異なりバイオマス比が減少したが，有明産P_1は10～1月にかけて他産地と同様に増加傾向を示す一方，1月下旬の測定時にはサンプルが水槽中で放精しているのを確認した。有明産以外では成熟開始時期にあたる6月上旬（数値)，出荷開始時期にあたる10月下旬の値はともに母貝集団とかなり近い値であった。

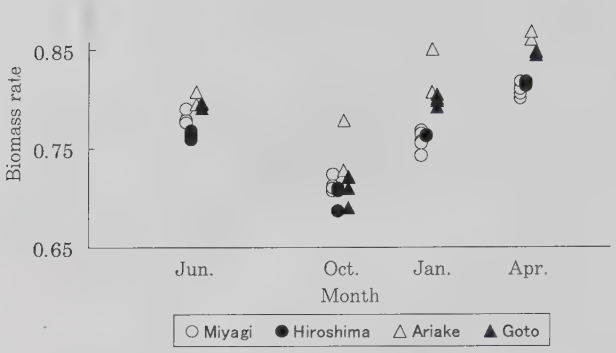


Fig. 14. Biomass rate of progeny groups. (Pocket mesh bag culture). Each symbol denotes the mean value for one mesh bag

Table 3. Differences in biomass rate among progeny groups (pocket mesh bags culture).

Groups	Mar	Jun	Oct	Jan	Apr
Hiroshina-Miyagi	**	*	—	—	**
Hiroshima-Ariake	—	*	**	**	—
Hiroshima-goto		—	**	**	
Miyagi-Ariake	**	**	**	**	**
Miyagi-Goto	**	*	**	**	**
Ariake-Goto	—	—	—	—	—

** ; Significant at 1% level, * ; Significant at 5 % level

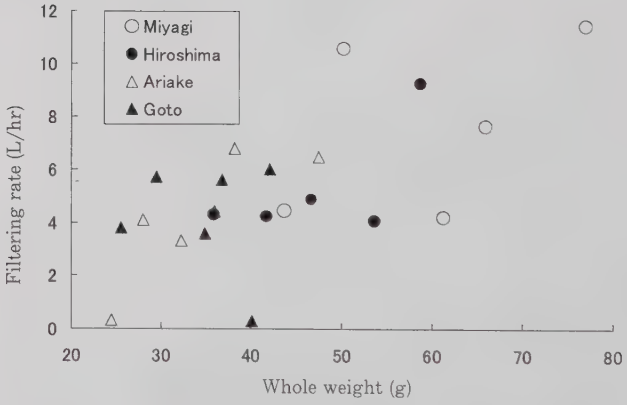


Fig. 15. Filtration rate of progeny groups. Indirect method by 20×10^3 cells of Pavlova sp. at 10℃. Each symbol indicates one individual.

間接濾過速度について，実験中ほとんど殻を閉じたままであった有明産と五島産の各1個体を除けば，ばらつきは大きかったが全体的には全重量に応じて濾過速度が増加する傾向にあった。しかし，全重量が同じ場合，産地内の個体差を上回るほどの産地間の差は見られなかった（Fig. 15)。

考　察

日本沿岸でマガキの繁殖促進や養殖を目的として他

海域産のカキを移入することは古くから行われ，我が国では元和５年（1619年）にはすでに和歌山から広島へカキが移植されたという記録が残っている（小笠原，1959）。明治以降各地で試験養殖が実施されるのに伴い，北海道東部から沖縄本島までの日本沿岸で他産地種苗の移入が行われてきた。その際の種苗としては主に広島産や宮城産の天然種苗が多く用いられ，現在でもなお宮城産種苗は各地に移入され養殖に利用されているが，継続的な養殖業としては定着せずに一時的な試験で終わった例も多いものと思われる。

過去に一時的あるいは数年にわたり移入された他海域産のマガキが，移入が途絶えた後も現地で再生産を繰り返して個体群を維持している可能性は充分考えられる。また，漂流物や船底への付着などにより偶然に侵入したマガキが旺盛な繁殖力によりその地で再生産を繰り返すことも同様に考えられよう。移入・侵入先にもともと独自のマガキ地方集団が存在していた場合，これらとの交雑は避け難いものと推察される。

本研究では地方集団の入手および採集の基準として，養殖の歴史が古く，他産地からの移入の経歴が把握し難い宮城および広島産では，それぞれの産地を代表する採苗場所のものを，一方，有明産および五島産ではできるだけ人為的移入の影響を排除するため過去に他海域からの種苗が移入された可能性が少ない場所を選定した。

Imai and Sakai（1961）は北海道（サロマ湖），宮城（万石浦），広島（草津），熊本のマガキ母貝を用い，系統内および系統間交配させた次代を同一環境で養成し，成長，斃死，殻の形質などについて各地方集団の特徴を調べた。その結果，成長速度は南方の地方集団ほど小さく，殻の形質も，南方のものほど小さく表面が波打ち黒味が強いと報告している。また，斃死率は広島産は北方海域で，北海道および宮城産は南方海域で高い値を示すが，有明産は各地で低い値を示すとした。さらに，これらの特徴は系統内交配によって維持されることから遺伝的な形質であると述べ，日本産マガキ地方集団の遺伝的研究の基礎を築いた。しかし，これらの交配には各々の産地から典型的な外観に基づき選択した雌雄各１個体だけを親貝として用いているため，成長や斃死が遺伝的要因の影響を受けやすくなおかつ集団内での変異が大きいとすると，選択した親貝の数の少なさに起因する偏り（Wright効果）が生じた可能性もあり，集団の特性を述べるためにはより多くの親貝を用いた交配が必要である。また，広島湾への宮城産種苗の移入はImai and Sakaiの研究当時から継続的に続いていて，宮城集団と広島集団の形質に現在でも差異があるのか調べる必要があると考えた。

マガキの人工受精では，親貝が充分な成熟状態にあれば加温等の刺激により産卵誘発が可能である。しかしその場合，全ての個体が同時に放卵・放精するとは限らず個体間で時間差が生じるため，複数個体を誘発法で受精させた場合はランダム交配からかけ離れたものとなる可能性が大きい。また，用いた親貝の成熟状態に差がある場合，全ての個体が放卵・放精するとは限らないので，複数の親貝を同一容器内で誘発・受精させる場合は交配に参加した個体数の把握が困難となる。さらに，全ての交配組間で環境要因の影響を同一にするためには同時に受精を行うのが理想的であるが，交配組間で精子や卵が混合してしまう危険性が大きくなる。これらを勘案し，本研究では交配組内での親個体の貢献度に大きな差を生じさせないために切開法を採用し，各地方集団ごとに受精可能と判定した親貝22～64個体（♂9～27個体，♀11～42個体）を用いて６日以内に交配を実施した。

親貝群，P_1とも北方の地方集団である宮城産がもっとも成長が良く，広島産がこれに次ぎ，有明・五島産がもっとも劣っている。この点はImai and Sakai（1961）が一対交配で示した結果と一致していた。このことは，過去に多くの広島産種苗が宮城海域に移入され，また，宮城産種苗が継続的に広島湾へ移入され続けている現在でもなお地方集団としての遺伝的な差異が存続していることを示していると考えられる。

母貝群は採取するまで産地によりそれぞれ異なった環境で成育していて，入手時期や養成開始時の大きさが異なっていたが，平均値で20g程度で採取後，同一海域で養成したときの全重量の増加傾向にみられる産地間の差は，種苗段階から一貫して同じ環境で飼育したP_1の結果とよく一致していた。このことから，種苗生産に用いた親の選択に偏りがなかったとするなら，平均重量20g程度に成長するまでの履歴（成育環境）が産地間である程度異なっていても，その後の成長差は本来の産地による差（遺伝的な差）を良く反映するものと考えられた。

一般的に，軟泥質の干潟などに生息するカキは，自身が底泥中に埋没するのに対抗するために殻高方向に大きく成長し，長細い外形をしたカキになると言われている（Galtsoff, 1964）。軟泥干潟漁場から採集した有明産の母貝群は，その生息環境を反映して入手時には殻高殻長比が高く他産地よりもかなり細長かったが，次世代では殻幅殻長比の高い膨らみのあるものとなった。Imai and Sakai（1961）は広島産や熊本産のカキは北方のカキより殻の膨らみが深いことを示している。このような殻の相対成長は絶対成長とある程度関連しているとも考えられ，全重量の増加速度が高い宮城産と広島産の殻幅殻長比は，増加速度の低い有明産と五

Table 4. Differences in mortality among parental groups.

	Miyagi	Hiroshima	Ariake	Goto
Hiroshima	**			
Ariake	**	—		
Goto	—	**	**	
Miyagi not narcotized	**	—	—	**

Data for October were tested by Turkey's method
** ; Significant at 1% level, * ; Significant at 5 % level

Table 5. Differences in mortality among progeny groups (June to October).

Pocket mesh bag method

	Miyagi	Hiroshima	Ariake
Hiroshima	—		
Ariake	—	—	
Goto	—	—	—

Collector method

	Miyagi	Hiroshima	Ariake
Hiroshima	—		
Ariake	—	—	
Goto	*	**	**

Cushion mesh bag method

	Miyagi	Hiroshima	Ariake
Hiroshima	*		
Ariake	**	**	
Goto	*	**	**

** ; Significant at 1% level, * ; Significant at 5 % level

島産よりも有意に小さい値を示した。しかし，全重量の増加速度が同程度であった有明・五島産間でも殻幅殻長比は大きな差があり，有明産のP_1の殻の外側に多く観察された棘状の突起や襞が影響して相対的に殻幅値を増加させた可能性もある。

作業工程の都合から約12時間かけて麻酔を施した宮城産P_0の斃死率は麻酔を施さない場合に比べ2倍近い値を示したが，これは高水温時の長時間に及ぶ麻酔操作が影響したものと思われたため，P_1では麻酔時間を4時間程度に短縮した。

P_0，P_1のコレクターおよびP_1のポケットカゴ養成ではいずれも五島産がもっとも高い斃死率を示した。Turkey法による生死数の検定の結果，五島産と宮城産の比較ではP_1のコレクター養成とザブトンカゴ養成で5％以下の水準でだけ有意差があった。五島産と広島産，五島産と有明産の間ではP_0ならびにP_1のコレクター養成でいずれも1%以下の水準で有意差があったが，P_1のポケットカゴ養成ではいずれの組み合わせでも有意差はなかった（Table 4, Table 5）。P_1のポケットカゴ養成は親貝に比べ全体的に斃死率が低く，地方集団間の差も小さかった。これは，麻酔方法や洗浄方法の改善など，操作上の問題が大きいものと考えられた。

10mm目の目詰まりしやすいザブトンカゴで継続して養成したP_1は，有明産以外では50%以上の高い斃死率を示したが，有明産の斃死率は15%であり，飼育条件として良好と思われるポケットカゴ並みであった。有明産はカキの生残にとって一般には不適と考えられる条件のもとで成育したときに他産地のカキに較べて低い斃死率を示す傾向がうかがえることから，マガキ地方集団の形質の差を評価する場合，遺伝的要因と環境的要因の交互作用を考慮する必要があることが示された。

母貝群では斃死率がもっとも高い五島産ともっとも低い有明産はどちらも共通して低い成長速度を示し，P_1のコレクター養成でももっとも高い成長速度を示す宮城産と低い成長速度を示す有明産の6～10月の斃死率に差が無いなど，地方集団間で成長と斃死との間に明らかな対応は認められなかった。劣悪環境でも斃死しにくい有明産と同じ南方の地方集団である五島産が斃死しやすい傾向を示し，この2つの地方集団は地理的に近いにも関わらず少なくとも斃死耐性に関しては相反する特性をもつことが明らかになった。

マガキは産卵や身入りに伴い軟体部の重量や水分含率が増減し，その指標として通常は個体を殺して身入り度（軟体部乾燥重量／殻内容積×1000）などの値を求める（沼知, 1971; Crosby and Gale, 1990）。しかし，個体単位で斃死と軟体部の増減の関係を調べる場合や選抜育種で利用する親貝を選定する場合などは個体を殺さずに連続して軟体部の増減を評価する手法が必要となる。バイオマス比はカキの成熟・産卵・身入りの時期にほぼ対応して変動し，軟体部容積／殻内容積と明らかな相関を示すことから，個体を殺さずに産卵・身入りの時期や程度を推定する指標として利用できる可能性が示された。ただし，日本国内のマガキは南方ほど多回産卵の性質があるとされる（沼知, 1979）にもかかわらず，本研究の母貝集団のバイオマス比では広島産や五島産と同様に宮城産も6月上旬から9月上旬にかけて段階的に減少する傾向を示したことから，これらの地方集団のバイオマス比の変動と実際の成熟・産卵の関係をさらに詳細に検討する必要がある。

広島湾のマガキ養殖では，近年の*Heterocapsa circularisquama*赤潮による斃死を除けば，産卵期か

ら産卵期直後にあたる8～10月にかけての斃死が問題とされている。養殖方法が日本と異なるアメリカ西海岸でも夏場の斃死が問題となっていて，いずれの場合も未だにその直接的な原因は特定されていない（Cheney *et al.*, 2000; Kusuki, 1990）が，性成熟及び産卵に伴って生理的活性が著しく低下する（森ら，1965a）ことが一つの要因であると推察されている。これに関し，堀(1950)はカキの斃死は高水温・高塩分の影響を大きくうける産卵前のものと，それ以外の産卵以後のものがあると述べ，前者の方が斃死率が高いと述べている。また，産卵前の斃死では抱卵量の多い大型のカキの斃死率が高いと言われ（日下部，1931），さらに森ら（1965a）は成熟したカキを高水温で飼育した結果，少量産卵個体の斃死率が高かったと述べている。

抱卵量が多い個体はバイオマス比も高いと考えられるが，本研究で各地方集団の母貝群について7月中旬時点で生存しているものと斃死したものの2群に分け，産卵期前の6月上旬のバイオマス比の平均値を2群の間で比較しても有意差は検出できなかった。また，6月上旬から9月上旬にかけてのバイオマス比の減少は産卵量を反映していると考えられるが，この期間の個体毎のバイオマス比の変動と9月上旬以降の生死との間にも明確な関係は見出せなかった。

このように本研究では個体単位でバイオマス比と斃死期の生死の間に明確な対応は見出せなかったが，麻酔処理の影響による斃死の増大が成熟や産卵による影響を不明確にした可能性も考えられる。今後この問題を解決するためには，より斃死の少ない麻酔方法の開発，あるいはその他の方法による個体のバイオマス測定手法の開発が必要である。

母貝群で他産地と明らかに異なるバイオマス比の推移を示した有明産が次世代で他産地とほぼ同様な推移を示したことに関しては産卵時期の遺伝性などの検討が必要であるが，親子集団間で違いが生じた原因の一つとして，母貝が採取以前まで成育していた何らかの環境が影響して他産地と異なる推移を示した可能性も考えられる。また，組織学的検討は行っていないが，有明産母貝群は10月でも水槽中で放卵・放精が確認されたことからこの時点で少なくとも一部の個体は成熟していたわけであるが，種苗生産は他産地と同時期の7月に行っているため，種苗生産に用いた有明産の親貝の選択に片寄りが生じた結果バイオマス比の推移が親貝群と相違した可能性もある。これらのことを考え合わせると，天然集団の特性評価や選抜育種では，用いる親貝の成熟・産卵に遺伝的要因と環境的要因がどのように作用しているかを探ることは極めて重要であると考えられた。

1-2　形質に及ぼす産地の差と養成水域の差の影響

本節では，マガキ種苗の産地の違い（遺伝的要因）と養成場所の違い（環境的要因）が形質に及ぼす影響を検討するため，広島産および宮城産マガキをそれぞれ複数の垂下点で養成し，両地方品種の全重量や軟体部重量など絶対的な成長に関する形質，殻長比や体積比等の相対的な形質を比較した。

方　　法

広島湾（1988年7月）および仙台湾（1988年9月）でホタテガイ貝殻製のコレクターを用い天然採苗した後抑制操作を行ったマガキ種苗を1989年5月に入手した。コレクター10枚を約2mの針金に通し換えて2本の針金をロープで繋ぎ，上下2つの垂下点をもつ養成連とした（Fig. 16）。養成にあたっては種苗の大きさに大きなバラツキが生じないように採苗連の上端下端それぞれ5枚のコレクターおよび付着数が極端に多寡なコレクターは使用せず，各養成連のコレクター1枚当りの平均付着数が30～40個体となるよう選別した。

これらの養成連を，広島湾北部に位置する大野瀬戸の2水域，すなわち宮島の北西に位置するカキ養殖漁場の筏（宮島水域）と南西海区水産研究所地先に位置する養魚用筏（水研水域）で各々深浅2点ずつ，合計4つの垂下点に垂下した（Fig. 16）。宮島水域の筏ではカキ養殖業者の養殖方法に合わせて養成連の水平・垂直的移動を行った。すなわち，垂下直後は競合生物であるムラサキイガイやフジツボ等の付着を避けるため養成連上部に約5mの針金（吊り手）を連結し，水深が深く潮流が比較的緩やかでカキ養殖用筏の密集した場所で深吊り養成を行い，10月のサンプリング後には身入り促進のため吊り手をはずして潮通りの良い場所へ筏ごと移動した。水研水域での養成では深吊りや筏の移動等は行わなかった。

宮島水域と水研水域の養成連は垂下後9月まで毎月1回付着物の除去作業を行った。10月以降はこの作業に伴いカキがコレクターから脱落することが懸念されたため，付着物の除去は行わなかった。

宮島水域と水研水域について，水温，塩分，透明度の測定，採水を毎月行った。採取した海水は0.45μmポアフィルターでろ過し－40℃で凍結保存後，Lorenzenの方法によりchlorophyll-a量およびpheopigment量を測定した。

カキのサンプリングは1989年6, 7, 8, 10, 12月，1990年2, 4, 6月に行った。サンプリングしたカキは殻高，殻長，殻幅，全重量，全容量，軟体部重量，軟体部容量，殻重量，殻容量等を測定し，一部の個体では真空凍結乾燥等を行い殻および軟体部の水分含量を求めた。

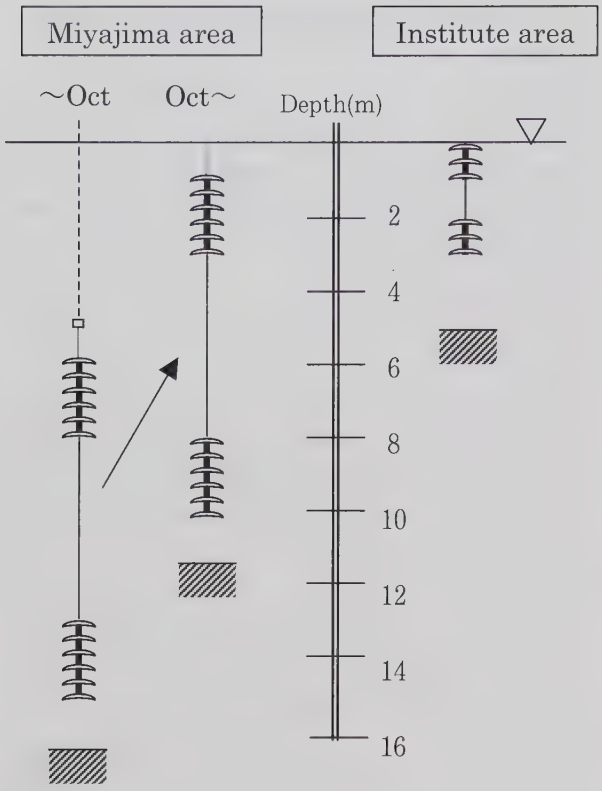


Fig. 16. Diagram of culture method at the Miyajima and Institute areas

外套膜縁辺部色は肉眼で濃，中間（まだら等も含む），淡の3段階に分け，各々に3，2，1の数値を割り付けて評価した。外套膜縁辺部色は8月まではカキが小さすぎて色あいの識別が困難であったので，8月以降に測定した。垂下前および1989年8月から1990年6月のサンプルの一部について消化盲嚢の一部を採取し，湿重量あたりのグリコーゲン重量をvan Handelの方法により測定した。計測個体数は各地方品種1垂下点につき1サンプリング当たり54個体を基本としたが，コレクターからの剥離が困難な垂下初期や斃死率が高い垂下点では計測数が少なく，最少12個体であった。また，身入り度算出用の軟体部乾燥重量は10個体，消化盲嚢部のグリコーゲン濃度は5個体を基本として測定した。水研水域のサンプルは1990年2月で使い尽くしたので以後の計測は宮島水域についてだけ行った。

種苗の産地の違い（広島，宮城），養成場所の違い（宮島水域上層，同下層，水研水域上層，同下層）および測定月の違いが各形質にどの程度影響を及ぼすかを推定するため，6，8，10，12および2月の値を用いて三元配置法による分散分析を行った。

各形質の平均値について，同一垂下点での産地間の差の有無は，産地間の母分散が異なると言えない場合はt検定で，産地間の母分散が異なるといえる場合はWelchの方法によるt検定で行った。外套膜縁辺部色の比率の差はカイ二乗法により検定した。

なお，種苗は入手時に広島産と宮城産の間でサイズが異なっていた（広島＜宮城）ため，外套膜縁辺部色以外のデータは5月と6月の全重量の値を目安に5月の養成開始日を養成場所ごとに4～13日分補正して両産地の養成開始時の全重量が等しかったものとし，続く各月の値は基準化（平均値＝0，分散＝1）してこの日数に応じて平均値と標準偏差を補正した後に基準化を解いて使用した。

結果および考察

広島湾は瀬戸内海の中でも季節により比較的強く成層する海域であり（武岡 1985），本研究で設定した養成海域も9月～3月の混合期以外は水温・塩分ともに成層がみられた（Fig. 17）。

観測された上層と下層の最大水温差は宮島水域で6.6℃，水研水域で4.4℃，最大塩分差は宮島水域で4.3，水研水域で8.1に達した。また，深吊り状態にある1989年5～10月の宮島水域は深吊りをしていない同時期の水研水域よりも最大で6.9℃水温が低く，さらに塩分変動も小さいなど，成層期間の垂下水深の違いは変温動物であるカキの生理状態に大きな影響を与えるものと推察される。

カキは他の多くの二枚貝類同様，植物プランクトンを主要な餌料としている。そのため養成海域のクロロフィルa量の多寡は餌料環境の良否を判断する目安とされ，一般的にカキ養殖には2 μg /L以上のクロロフィルa量が必要であると言われている。また，楠木(1977)によれば9月～翌1月の広島湾でのクロロフィルa量とマガキの増肉量の間には正の相関があるという。

1989年5月～1990年4月までの1年間での水研水域と

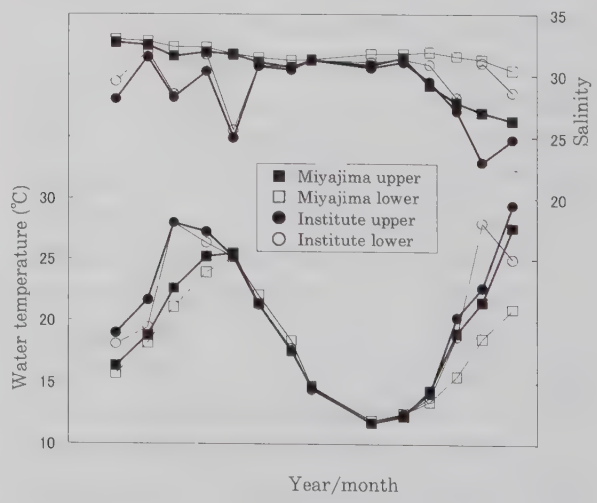


Fig. 17. Water temperature and salinity

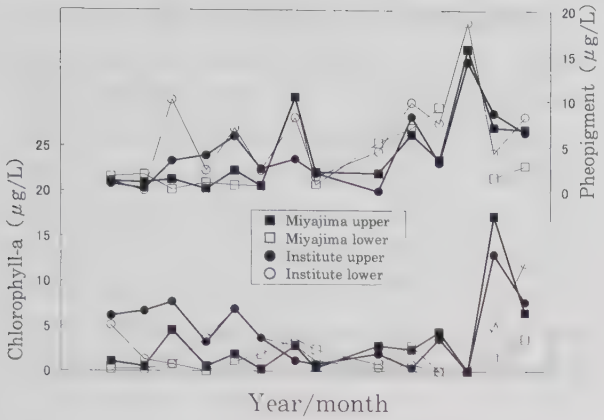


Fig. 18. Concentration of chlorophyll-a and pheopigment

Fig. 19. Sum of chlorophyll-a and pheopigment (Chl+Pheo) and transparency

Table 6. Mean value and ratio of chlorophyll-a and pheopigment concentrations

Culture spot	Chlorophyll-a (μg/L)	Pheopigment (μg/L)	Chl-a + Pheo (μg/L)	Pheo/Chi-a
Miyajima upper	2.0	2.8	4.7	1.4
Miyajima lower	1.3	3.5	4.8	2.8
Institute upper	3.9	3.1	6.9	0.8
Institute lower	2.4	4.9	7.4	2.0

'89.5～'90.4

宮島水域のchlorophyll-a量は全体で0.0～7.8μg/Lの範囲にあり（Fig. 18），この期間の平均値では宮島水域下層で1.3μg/Lと低い値を示している（Table 6）が，これは10月までの深吊りによる影響が大きいと思われるとともに，10月までは周囲に養殖筏が密集しているため水柱当たりの餌料量が少なかったことが透明度からうかがえる（Fig. 19）。水研水域では上下層とも宮島水域のほぼ2倍のchlorophyll-a量を示し，餌料が豊富な水域であることをうかがわせる。年平均値でみると両水域ともにChlorophyll-a量は上層が下層より1.5倍程度多い一方，下層でのpheopigment量はchlorophyll-a量の2倍以上を示し，chlorophyll-aとpheopigmentの総計は上下層ともほぼ同じ値になる。分解過程にある植物プランクトンもカキの餌料になっているとすればpheopigment量は無視できない大きさである。

宮島水域と水研水域の間は1～2kmと距離が近いにも関わらず，カキの養成に関わる環境条件は上記のように大きく異なっていると言える。

形質について，長さ，重量，容積など絶対成長に関する形質や斃死率，外套膜縁辺部色の割合といった形質を本研究では「絶対的な形質」と呼ぶことにする。また，殻高／殻長や軟体部重量／全重量など絶対的な形質どうしの比率からなる形質や軟体部や殻の水分含率などを「相対的な形質」と呼ぶことにする。

産地(Locality)，養成場所(Spot)，月(Month)を因子とした三元配置分散分析の結果（Table 7）を見ると，全重量，軟体部湿重量，殻部湿重量など成長に関する絶対的な形質について測定月の効果が有意なのは当然だが，全体的に多くの形質で産地および養成場所の主効果が1%以下の水準で有意となっていて，産地や養成場所の違いが各形質に及ぼす影響は大きい。

カキの重量に関する形質である全重量，軟体部湿重量および殻の湿重量（以下，殻部湿重量と記述）では産地×月の交互作用も1%以下の水準で有意となっていて，これらの形質では産地間の差の現われ方は測定月により異なる傾向があるといえる。一方，全重量では産地×養成場所の交互作用が5%以下の水準で有意であったが，軟体部湿重量と殻部湿重量では5%水準でも有意ではなく，カキの部分的な重量に関するこれら2つの形質は養成場所が異なっても産地間の差の現われ方はあまり変わらないといえる。

全重量の平均値は宮島水域上下層で8～10月の一時期に産地差が無くなるのを除き，ほぼ一貫して5%以下の水準で広島＜宮城の傾向を示した（Fig. 20）。一方，水研水域上下層では8月までの間は産地間の差があまり明確ではなく，10月以降に明確になる（Fig. 20）。

軟体部湿重量の平均値は，各垂下点で出荷時期である10～12月以降に多少とも産地差が開く傾向があり，比較的成長の優れている宮島水域上層と水研水域下層では産地間に1％以下の水準で有意な平均値の差（広島＜宮城）が現れる（Fig. 21）。殻部湿重量の平均値はこれらの垂下点で養成期間中一貫して5％以下の水準で産地間の差が有意であり，その他の垂下点でも産地差が5％以下の水準で有意となる測定月は多い（Fig. 22）。カキの容積に関する形質である全容積，殻部容積，殻内容積は全重量とほぼ同様な変動傾向を示した。

5～8月の間，水研水域は宮島水域上層に比べて餌料が豊富であるが，全重量の値は必ずしもこの差を反映していず，同一産地の平均値は両垂下点間で大差無い。それにも関わらず，宮島水域上層と異なり水研水域では全重量の平均値の産地差は出難く，この違いは餌の量とは対応していない。5～8月の水温に注目してみると，宮島水域では水研水域よりも低く推移している。餌が少なく成長の悪い宮島水域下層でも産地差が明確に現れることと考え合わせると，この時期の全重量や軟体部湿重量の平均値の産地差の現れ方は餌の量とは

Table 7. Results of three-way ANOVA for characters of cultured oysters

Character	Main effect			Interaction				F-test between variances of main effect		
	Locality	Spot	Month	Locality × spot	Locality × Month	spot × Month	Locality × Spot × Month	Locality>	Spot>	Mouth>
Shell height (SH)	**	**	**	—	—	**	—	—	—	—
Shell length (SL)	**	**	**	—	—	**	—	—	—	—
Shell width (SW)	**	**	**	*	**	**	**	—	—	—
Whole weight (TW)	**	**	**	*	**	**	**	—	—	—
Fresh wet weight (FWW)	**	**	**	—	**	**	**	—	—	—
Shell wet weight (SWW)	**	**	**	—	**	**	**	—	—	—
Shell dry weight (SDW)	**	**	**	**	**	**	—	—	—	—
Whole volume (TV)	**	**	**	*	**	**	**	—	—	—
Shell volume (SV)	**	**	**	**	**	**	**	—	—	—
Shell cavity volume (CAV)	**	**	**	*	**	**	**	—	—	—
Color of mantle	**	—	**	—	—	*	—	S**,M*	—	—
Ratio of oysters having dark mantle edge	**	*	**	—	—	—	—	S*	—	—
Ratio of oysters having light mantle edge	**	—	—	—	—	—	—	S**,M*	—	—
SH/SL	**	**	**	—	—	**	—	—	—	—
SH/SW	**	**	**	*	**	**	**	M*	M**	—
SW/SL	**	**	**	—	*	**	—	—	L**	L**
Swell index－1	**	**	**	**	**	**	—	—	—	—
Swell index－2	**	**	**	*	**	**	**	—	M**	—
Shell cavity ratio (CAV/TV)	**	**	**	*	**	**	*	S*,M**	—	—
FWW/CAV	**	**	**	**	**	**	—	—	—	—
Condition index	**	**	**	—	**	**	—	—	—	—
FWW/TW	**	**	**	**	**	**	—	—	—	—
FWW/SWW	**	**	**	*	**	**	—	M*	—	—
SWW/TW	**	**	**	—	*	**	**	M*	—	—
Shell density (SWW/SV)	—	**	**	—	—	**	—	—	—	—
Water content of flesh	—	**	**	—	**	**	*	—	L*	L*
Water content of shell	—	**	**	—	**	**	—	—	—	—
Glycogen content of digestive gland	—	**	**	—	—	**	—	—	L*	S*,L**

**：signature at the 1% level　*：significant at the 5% level　－：not significant
Swell index－1＝SW/SH×100,　Swell index－2＝SW×200/(SH+SL),
Condition index＝Fresh dry weight/CAV×1000　L：Locality, S：Spot, M：Mouth

あまり関係なく，水温がほぼ25℃以下の場合に現われやすいものと考えられる。

殻高，殻長，殻幅は殻の一次元的な長さに関する絶対的な形質であるという意味では同様な形質であり，いずれについても産地，養成場所，測定月の各主効果は全重量や軟体部湿重量等と同様にすべて1％以下の水準で有意であったが（Table 7），産地間の差の現われ方はそれぞれで若干異なっている。

殻高は水研水域上層以外でほぼ全期間にわたり，水研水域上層では10月以降，平均値の産地間の差が5％以下の水準で有意に異なった（Fig. 23）。殻長は6月から8月までは産地間に差が無く，10月から産地間の差が明確になる傾向にある（Fig. 24）。しかし，3元配置分散分析の結果からは殻高，殻長について産地×養成場所の交互作用は殻部湿重量のそれと同様に5％水準でも有意ではなく（Table 7），養成場所によって産地間の差の現われ方が明らかに異なるとはいえない。一方，殻幅の産地×養成場所の交互作用は全重量のそれと同様に5％以下の水準で有意であり，養成場所によって産地間の差の現われ方が異なる傾向がある。具体的には，宮島水域下層では有意な産地間の差は終始みられないが，他の垂下点では10月以降に5％以下の水準で有意な産地間の差が現れる（Fig. 25）。すなわち，宮島水域下層は他の垂下点に比べて殻幅について産地間の差が現れにくい。10月以降は海水の鉛直混合期にあたるため水温や塩分は上下層で大きな差があるとはいえず，また，餌料との対応も不明確であり，殻幅の産地差の現れ方にはこの他の何らかの要因が影響していると考えられる。

また，殻幅は殻高や殻長と異なり産地×月の交互作用も1％以下の水準で有意であり，全体的には測定月によっても産地間の差の現われ方が影響を受ける傾向にあることがうかがわれる。すなわち，宮島水域下層の例外はあるが，全体的に8～10月以降に産地間の差が明瞭になる。

殻長・殻高の増加はどちらも主に外套膜外縁部の貝殻形成能力に左右されるが，殻幅の増加はこれに加え外套膜表面の貝殻形成能力や殻室の形成能力等に負うところが大きいと考えられる。上記の結果から，広島，宮城地方集団間ではこれらの能力に何らかの差があると考えられる。

月ごとの環境データであり養成場所の環境特性を充分に把握していない可能性もあるが，絶対的な成長に関する形質と環境条件の間の関連は，もっとも餌が少ない宮島水域下層がもっとも低く推移していること以外は明らかな対応は見られない。

斃死率に関し，全体的にはどの垂下点でも養成開始時から一貫して低下してゆく傾向にあり，水研水域ではサンプリング時ごとの養成連間の差が原因と思われる測定月間のバラツキが特に大きいが，同一垂下点での産地間の明確な差は見られなかった（Fig. 26）。

外套膜縁辺部色に関しては，全体的な傾向として養成場所や養成方法が違っても濃色個体の割合は広島産に多く，淡色個体の割合は宮城産に多いケースがほぼ安定してみられる（Fig. 27～Fig. 29）。三元配置分散分析の結果は外套膜縁辺部色，濃色個体の割合および淡色個体の割合全てで産地の主効果は1％以下の水準で有意である（Table 7）。また，外套膜縁辺部色と淡色個体の割合については養成場所の主効果は5％の水準でも有意ではなく，これらは養成場所の違いに直接影響されるとは言えない。外套膜縁辺部色および濃色個体の割合では測定月の主効果が1％以下の水準で有意となっているが，これは濃淡の判断を目視で行っているため，時間的に離れた各測定月間で測定者の基準が異なった可能性が有る。

カキの軟体部の外套膜縁辺部は殻が新生される場所であるが，そこに分布する色素の役割は明らかではない。Imai and Sakai（1961）は，北海道，宮城，広島，熊本の各地方集団から選んだ代表的な雌雄個体の一対交配のF_1の殻色を5段階に分けて評価し，各地方集団間で明瞭な差があるとしたうえ，「従って外套膜縁辺部の色も（同様である）」としていて，遺伝的要因に左右される形質であることを示している。また，高槻（1949）はカキの外套膜縁の色について，「日光に直射される所に棲息するものは濃色であるが，日影の所に棲息するものは淡色である」と述べ，光環境にも左右される形質であるとしている。一方，Galtsoff（1964）はアメリカガキ*C. virginica*の外套膜周縁部の色について，同時に成育した同一起源の集団内でもしばしば変異がみられ，地理的な位置や底質との関連はみられないと述べている。

本研究では，外套膜縁辺部色に関する形質はいずれも有意な産地差があるうえ産地×養成場所，産地×測定月の交互作用は5％水準でも有意では無いことから，産地差は養成場所の違いや測定月の違いに左右されずに安定して現れるものであると考えられた。しかし，産地間での外套膜色の比率の差は，百分率で濃色個体の比率で0.2ポイント程度，淡色個体の比率で0.1ポイント程度であり，実数として大きな差であるとは言えない。また，高槻（1949）が述べたように光条件に影響されるとすると，日光の影響を強く受ける潮間帯に棲息するカキを比較の対象に含めた場合，養成場所の効果は本研究の結果よもり大きくなる可能性もある。

広島湾を養殖場とするカキ養殖業者の間では，外套

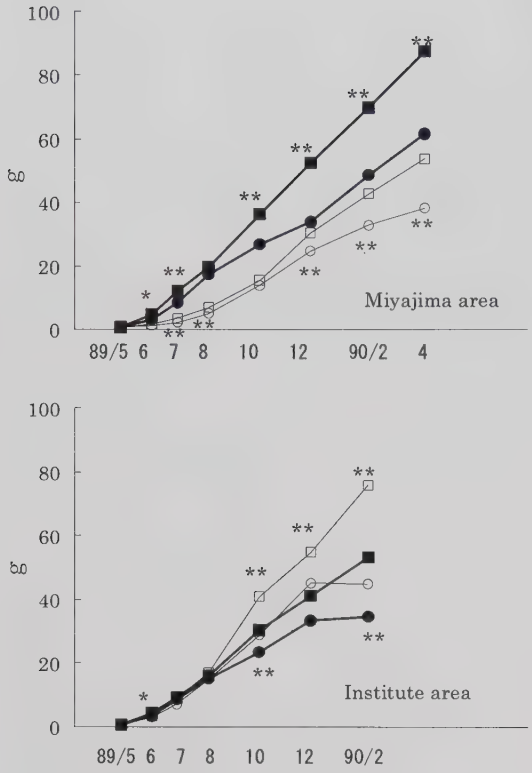


Fig. 20. Whole weight

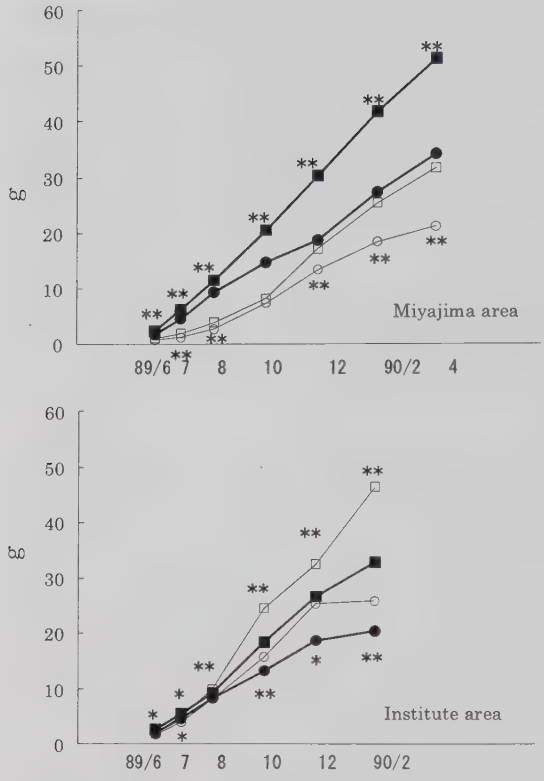


Fig. 22. Shell wet weight

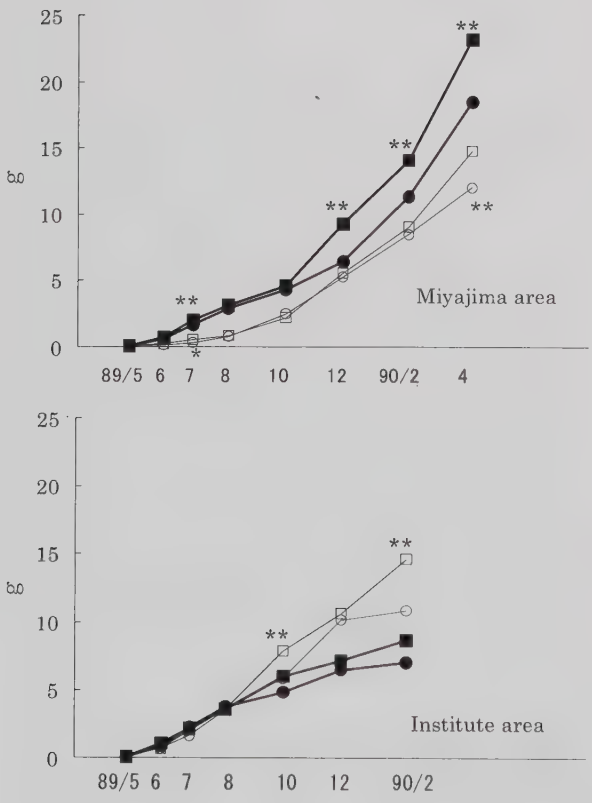


Fig. 21. Flesh wet weight

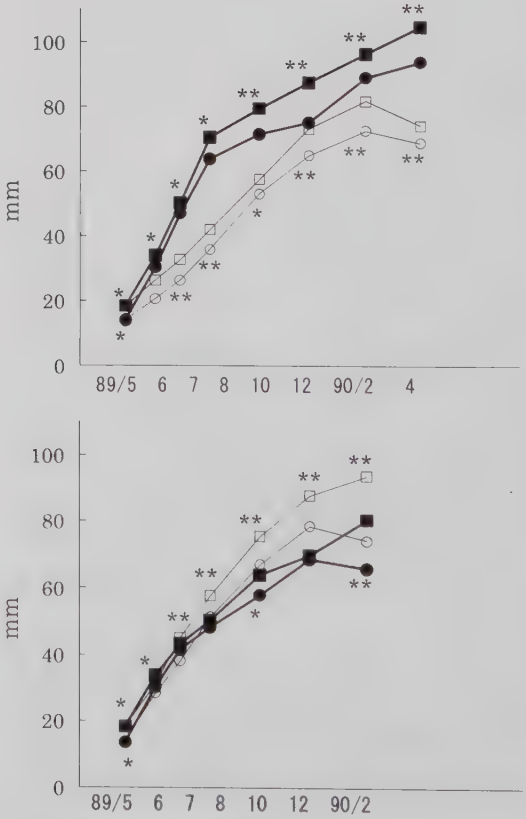


Fig. 23. Shell height

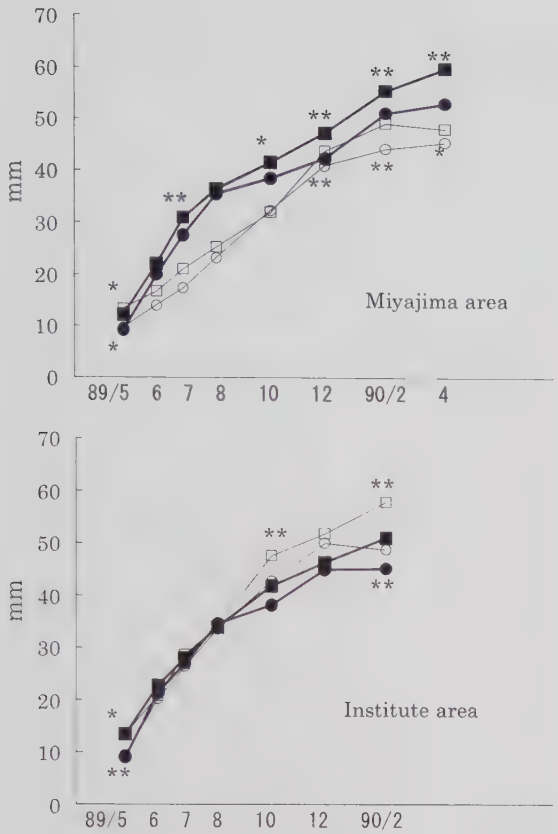


Fig. 24. Shell length

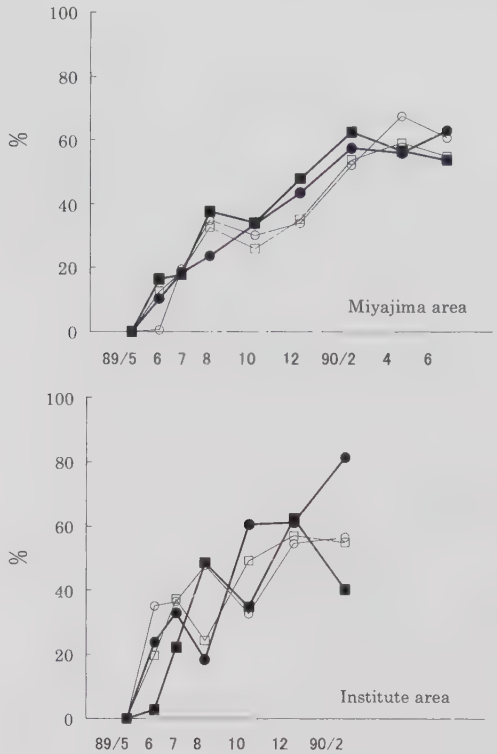


Fig. 26. Mortality. Significances of differences were not tested

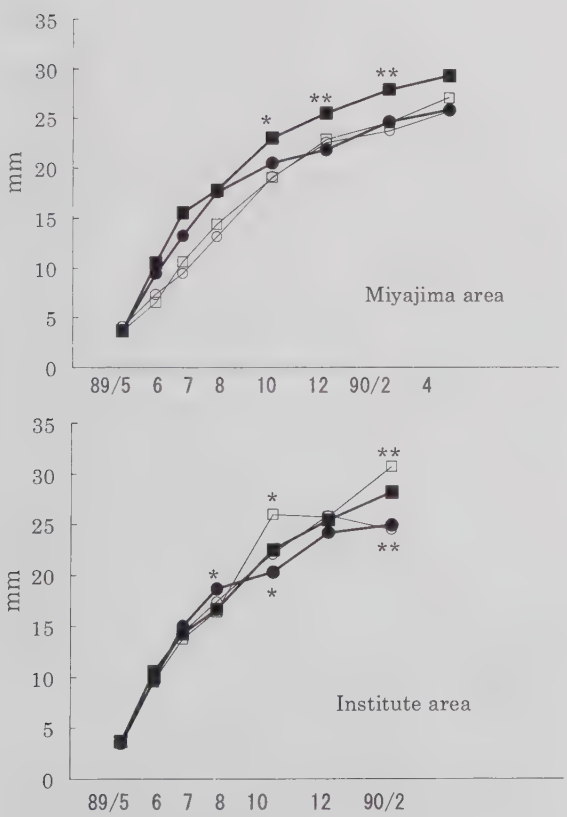


Fig. 25. Shell width

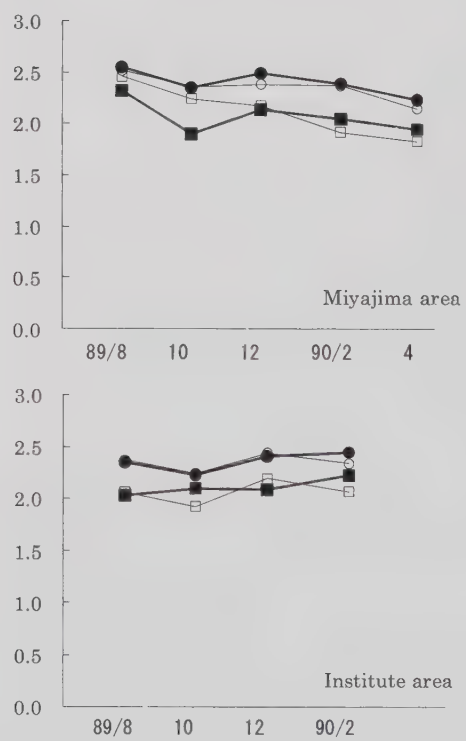


Fig. 27. Quantified color of mantle edge. Dark, middle and light colored edges were quantified as 3, 2 and 1, respectively. Differences between mean values were not tested.

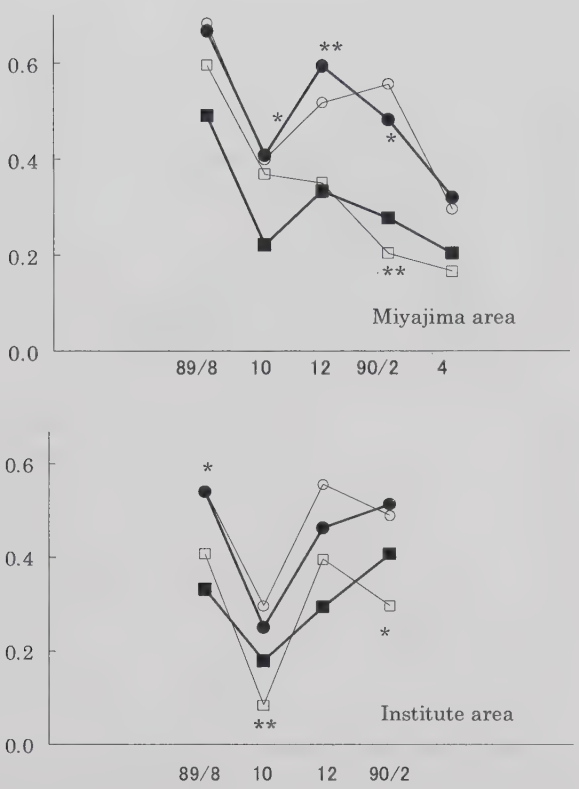


Fig. 28. Ratio of oysters having dark colored mantle edges

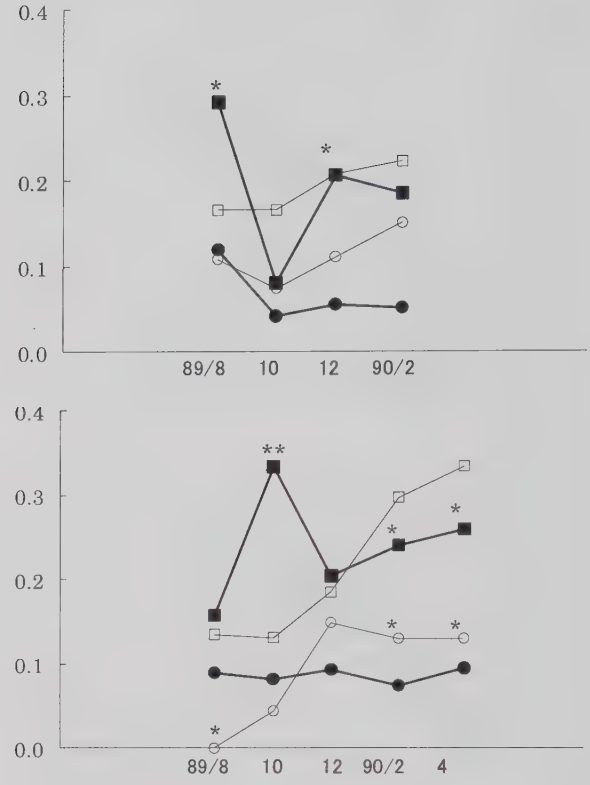


Fig. 29. Ratio of oysters having light colored mantle edges

膜縁辺部の色が濃いものが広島のカキとして一種のブランド視され，広島湾に移入されている宮城産種苗との交雑により淡色化が進むことを懸念する声がある。本研究では殻色については調べていないが，Imai and Sakai (1961)の研究時の殻色の結果がそのまま外套膜縁辺部色にも当てはまっていたものとすると，当時は本研究の結果よりも明瞭な地方差があった可能性もあり，宮城種苗の移入などにより広島地方集団の特質が消失しつつあることが危惧される。

絶対的な形質同様，相対的な形質の多くも三元配置分散分析で産地，養成場所，月の主効果が1%以下の水準で有意となっていて，産地や養成場所の違いが大きく影響している (Table 7)。

殻内容積比，軟体部湿重量／殻内容積，軟体部湿重量／全重量，軟体部湿重量／殻部湿重量および膨らみ1，2については，産地×養成場所，産地×月の交互作用も1%または5%以下の水準で有意となっている。この中でも殻内容積比 (Fig. 31) および軟体部湿重量／殻部湿重量 (Fig. 34) はほぼ全期間に亘り平均値の産地差が明確であるうえ，産地の効果は月の効果よりも5%以下の水準で有意に大きい。また，殻内容積比について産地の効果は養成場所の効果と比較しても5%以下の水準で有意に大きく，殻内容積比は相対的な形質の中でもっとも明確な産地差を示すと言える。

殻内容積比はカキの全容積に対する軟体部が収まる空間の容積の比率を表わし (Fig. 30)，この値が小さいと個体の容積あたりの軟体部重量は大きな値が期待できないことになる。殻内容積比は宮島水域下層以外では全期間を通じほぼ一定した値を示すのに対し，宮島水域下層では6月～10月にかけて宮城産の値が上昇して広島産のレベルに近づき10～12月には産地間の有意差が一時的に無くなるが，2月以後は宮城産の値が下降し再び産地間の差が現れる(Fig. 31)。宮島水域下層は垂下直後から10月までは深吊りを行っていて，他の垂下点と比べて低温でかつchlorophyll-a量が少なく，全重量は他の垂下点と比べかなり低い値で推移している。劣悪な餌料環境はカキの成長の直接的な制限要因であり，宮島水域下層のchlorophyll-a量とpheopigment量の合計は5月～10月の平均値で約1.7 μg/Lと非常に低い (Fig. 19)。殻内容積比は本来は産地間の差が明瞭に現れる形質と考えられるが，このように餌料が不十分で成長の悪い場所では成長するにつれて産地間の差が不明確になりやすいものと思われる。Ohkoshi *et al.* (1987)は宮城産と広島産のマガキを宮城県の2水域で養成して殻室の形成状態を調べた。その結果，広島産はどちらの水域でも殆ど殻室を形成しないのに対し，宮城産は2水域のうち一方で多くの殻室を形成したことから，マガキの殻室形成は遺伝的要因と環境要

因の両方に左右されると述べている。殻容積の増大が殻室の形成に起因するものと考えると，本研究での殻内容積比の結果はOkoshi *et al.*(1987)の結論とも矛盾しない。

相対的な形質の中で軟体部湿重量を分子に持つものは，養成場所により異なる変動傾向を示す。宮島水域上層および水研水域下層は，全重量や軟体部湿重量の推移からどちらも成長が良い垂下点と考えられ，垂下直後から身入が開始する10月までは両垂下点ともこれらの形質の値は若干下降する傾向にあるが，続く身入り期である10月以降は宮島水域上層では垂下当初の値を上回り上昇して行くのに対し，水研水域下層ではほぼ横ばいあるいは下降傾向にある。これは，宮島水域上層に比べ水研水域下層で軟体部湿重量の増加が鈍いためであると思われる。また，軟体部と殻の比率である軟体部湿重量／殻部湿重量はほぼ全期間を通じて産地差が明確である一方，殻内容積に占める軟体部の割合を示す軟体部湿重量／殻内容積（Fig. 32）は10～12月以降に産地差が明確になる。身入り度（＝軟体部乾燥重量／殻内容積×1000）（Fig. 35）は各主効果が有意で軟体部湿重量／殻内容積と同様な変動傾向を示し，宮島水域下層では10～2月にかけて明らかな産地差（広島＞宮城）が現れるが，産地×養成場所の効果は5％水準でも有意では無い。これは，おそらくサンプル数の少なさによるものと推察される。

近年，カキは殻付きで出荷される量が多くなってきている。殻付き出荷用のカキは，通常どおりコレクターに付着させて養成したカキの中から殻のプロポーションなど外見的特長に基づいて選別したものをカゴに収容して一定期間養成したのちに収穫していて，従来，産業的には直接重要視されていなかった殻長殻幅比などの殻の相対的な形質が，重要な形質として認識されつつある。カキ類の殻の形は育った環境による変異が大きく，異なる環境下で育ったものどうしを殻の形だけに基づいて同定することはしばしば困難とされる（稲葉，1993; Carriker, 1996）が，同一環境で育った地方集団間で殻の形について異なる傾向が認められれば，それは遺伝的要因によるものと考えられる。

殻高／殻長（Fig. 36），殻高／殻幅（Fig. 37），殻幅／殻長（Fig. 38）はいずれも殻の長さの比に関する形質であるが，それぞれで傾向が異なった。

殻高／殻長は産地，養成場所，月の3つの主効果いずれもが1％以下の水準で有意であるが，産地×養成場所，産地×月の交互作用は5％水準でも有意差が認められず（Table 7），養成場所や月が異なっても産地間の差の現われ方は異ならない傾向が強いといえる。

一方，殻高／殻幅は月の主効果が5％水準でも有意でなく，測定月の違いによる一定の傾向は見られないが，産地×養成場所の交互作用が5％以下の水準で有意であり，殻高／殻長とは異なり養成場所により産地間の差の現われ方が異なる傾向に有る。具体的には，宮島水域，水研水域ともに上層に比べて下層の方が産地間の差が大きい傾向にある。殻の長さの比のうち殻幅／殻長は先の2つと異なり産地の主効果が5％水準でも有意でなく，産地間で差が現れない傾向に有る。

膨らみ1および膨らみ2（Fig. 39，Fig. 40）は，ここではそれぞれ殻高×殻長という二次元的な広がりおよび殻高＋殻長という一次元的な和に対して殻幅がどの程度の大きさを示すかという指標である。双方とも全ての主効果と2因子間の交互作用が5％以下の水準で有意であり，特に膨らみ1では殻高／殻幅同様，宮島，水研各水域上層で産地間の差が現れにくい傾向に有る。宮島水域での絶対成長は上層＞下層，水研水域では上層＜下層であり，殻幅に関する相対的な形質の産地間の差の現れ方は絶対成長とは対応しない。水温，塩分chlorophyll-a量とも特に関連はみられず，流速などこれら以外の環境要因が影響していると思われる。

殻部密度，軟体部水分含率，殻部水分含率はいずれも養成場所と月の効果が1％以下の水準で有意であるが産地の影響は5％水準でも有意でないことから，環境に強く依存し産地間の差は出にくい形質であると言える。このうち殻部密度は水研水域では養成期間中1.9～2.1の間の値をほぼ横ばい状態で推移しているが，宮島水域では養成開始時（1.7～1.9）から養成終了時（2.0～2.2）にかけて上昇している（Fig. 41）。特に2～4月にかけての宮島水域は海水の鉛直混合期にあたり上下層の水温・塩分等の差が殆ど無いにも関わらず殻部密度は上下層間の差が明らかに開いてゆく傾向にある（Fig. 41，Table 8）。殻室の形成は殻の密度を低下させると考えられるが，ここでは殻内容積比にみられたような明確な産地差はみられなかった。軟体部水分含率および殻部水分含率は身入り期である10月以降，宮島水域で水研水域に較べて明確に減少してゆく傾向にある（Fig. 42，Fig. 43）。

カキは貯蔵エネルギー源としてグリコーゲンを利用する。カキのグリコーゲンの貯蔵細胞は唇弁，外套膜，生殖巣域や結合組織，鰓，消化管に存在する（Berthelin *et al.*, 2000）が，グリコーゲンは特に秋から冬にかけて外套膜下の結合組織を中心にさかんに蓄積され，その後配偶子形成や産卵にともなって消費される（Masumoto *et al.*, 1934）ため，軟体部重量あたりのグリコーゲン量は周期的に増減することが知られ，製品としてのカキの品質と直接関連している。一方，森ら（1965a）は人為的に水温を調節した環境下

でマガキを飼育した結果，32℃の高温区で産卵後に出現した閉殻筋力喪失個体と正常個体の間で外套膜縁や内臓部位（消化盲嚢を含む）でグリコーゲン濃度の差が大きいことを示した。これは，外套膜縁や消化盲嚢のグリコーゲンの濃度が斃死などと関連した生理状態の指標として利用できる可能性を示唆している。本研究ではこの点に着目し，消化盲嚢部のグリコーゲン濃度の変化と種苗の産地や養成場所との関連を調べた。三元配置分散分析の結果，主効果については殻密度や軟体部水分含率と同様に，養成場所と月の効果は1％以下の水準で有意であり産地の影響は5％水準でも有意でない。養成場所との関連をみてみると，宮島水域では深吊り状態にある8，10月は宮城産，広島産とも1％以下という低い値で（Fig. 44）エネルギー蓄積が低い状態にあることを示し，この期間の同水域の植物色素量（chlorophyll-a量＋pheopigment量）の低さと対応する。一方，同期間の植物色素量が多い水研水域ではカキの成熟期である8月でも比較的高い値を示す。また，10月以降吊手をはずして身入り漁場に移動した宮島水域では植物色素量，特にpheopigment量の増加とともにグリコーゲン量が増加し，水研水域では10〜翌2月まで植物色素量は減少傾向にあり，グリコーゲン濃度の増加も鈍い。このように消化盲嚢中のグリコーゲン濃度は養成場所の植物色素量とよく対応して増減したが，斃死率との明らかな対応はみられなかった。種苗の産地との対応では，宮島水域上層の1989年12月および1990年2月の宮城産，同1990年6月の広島産のように同一時期同一垂下点でも個体間で大きなばらつきが生じる例があり，消化盲嚢中のグリコーゲン濃度の変動傾向に種苗の産地間で明確な差は見出せない。

消化盲嚢中のグリコーゲン濃度の個体差が大きいことから，今後，特定組織中のグリコーゲン濃度と斃死等の関連を解明するには，個体を殺さずに連続して組織中のグリコーゲン量が測定できる技術の開発が必要であると考えられた。

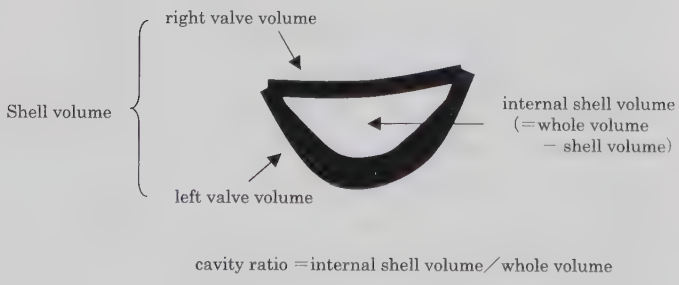


Fig. 30. Conceptual diagram of cavity ratio

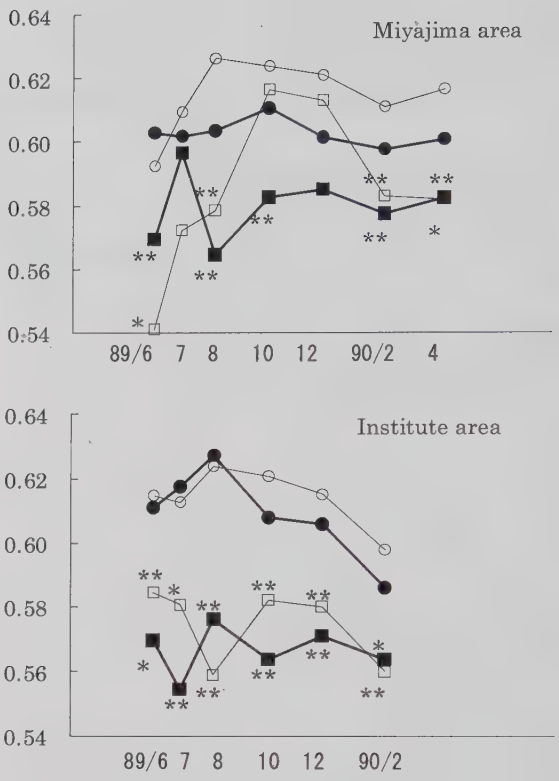


Fig. 31. Cavity ratio

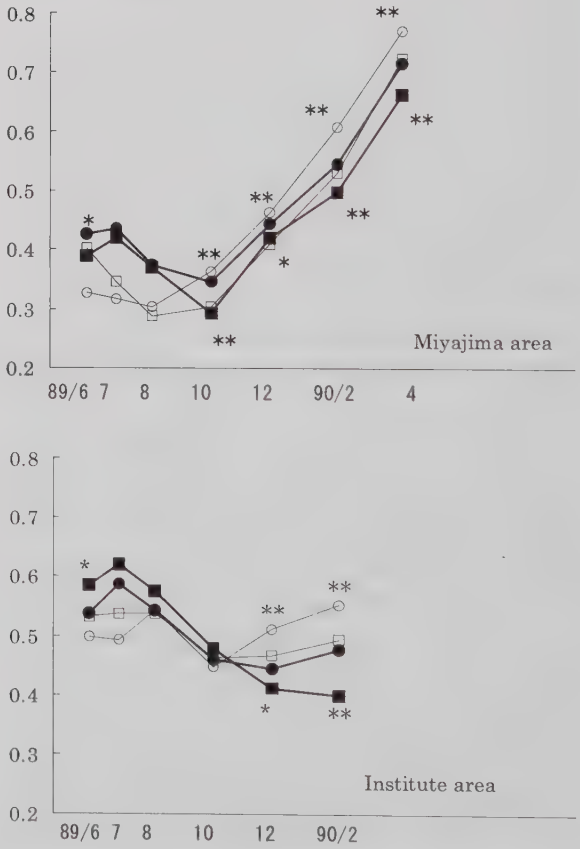


Fig. 32. Flesh wet weight/volume of internal shell cavity

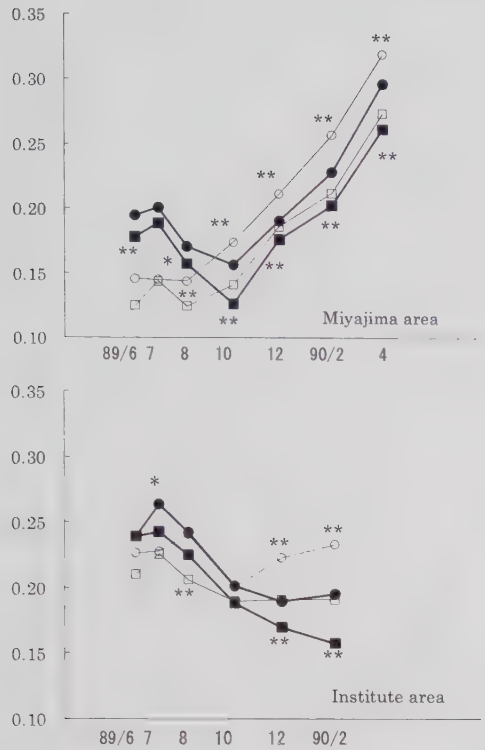


Fig. 33. Flesh wet weight/ whole weight

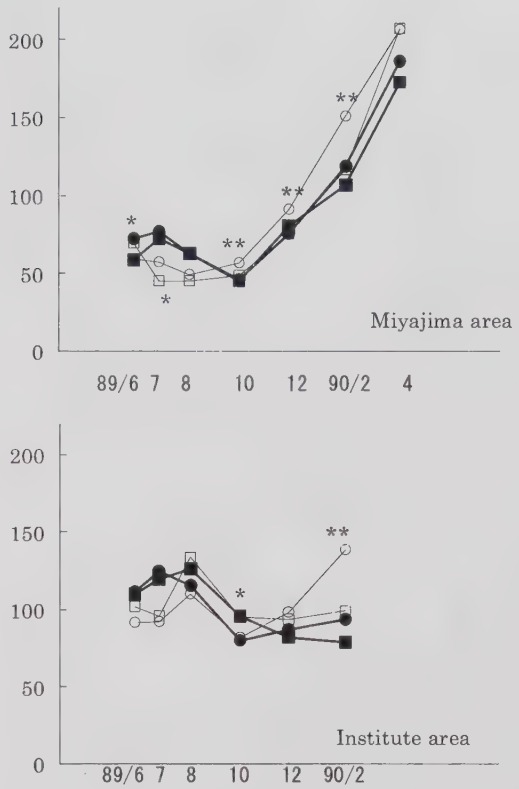


Fig. 35. Conditon index. condition index ; Flesh dry weight/ volume of internal shell cavity×1000

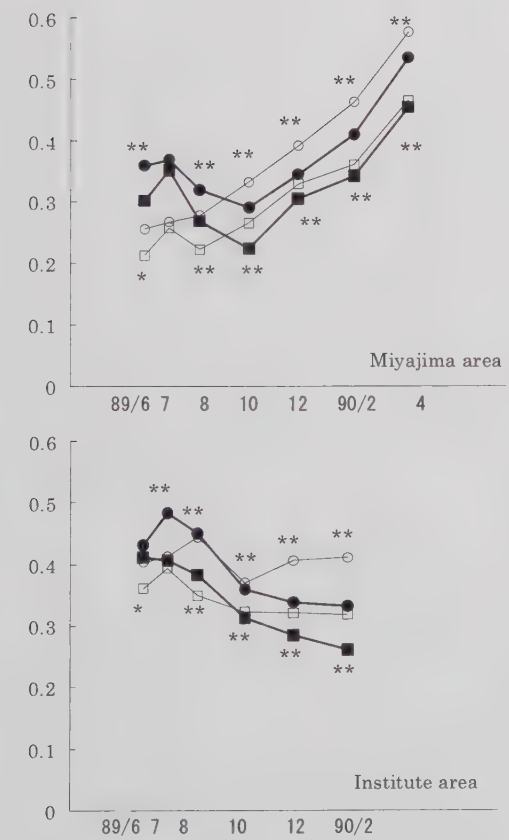


Fig. 34. Flesh wet weight/ shell wet weight

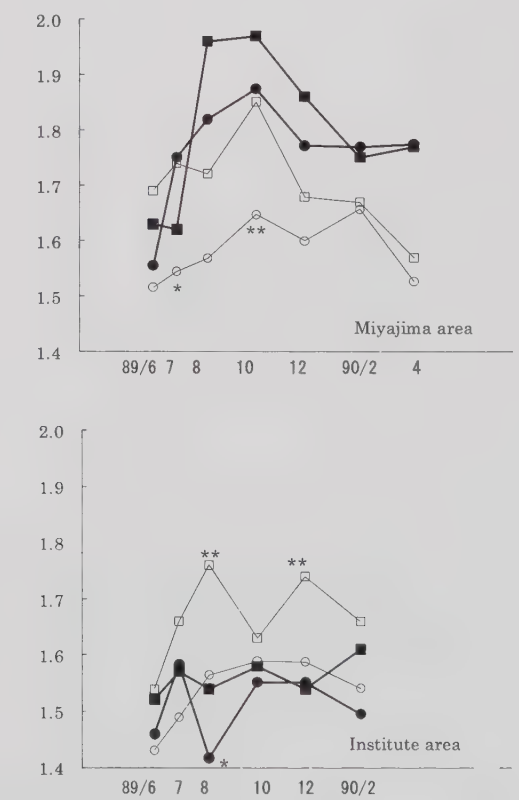


Fig. 36. Shell height/ shell length

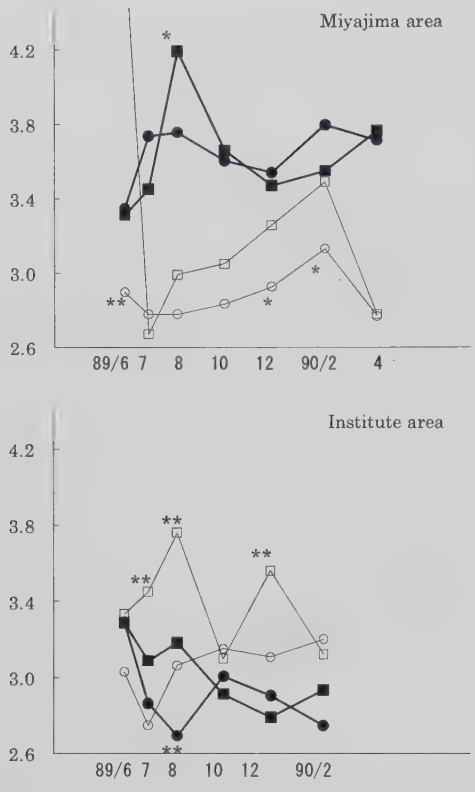


Fig. 37. Shell height/ shell width

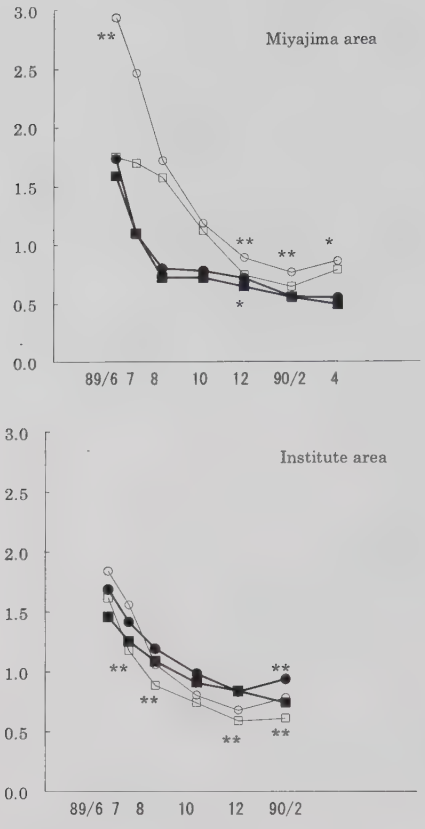


Fig. 39. Swell Index - 1
Swell index-1=SW/SH/SL×100

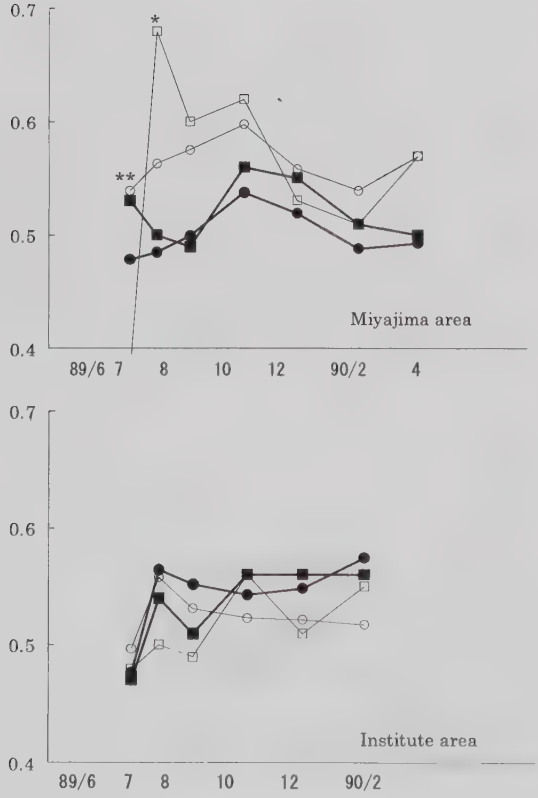


Fig. 38. Shell width/ shell length

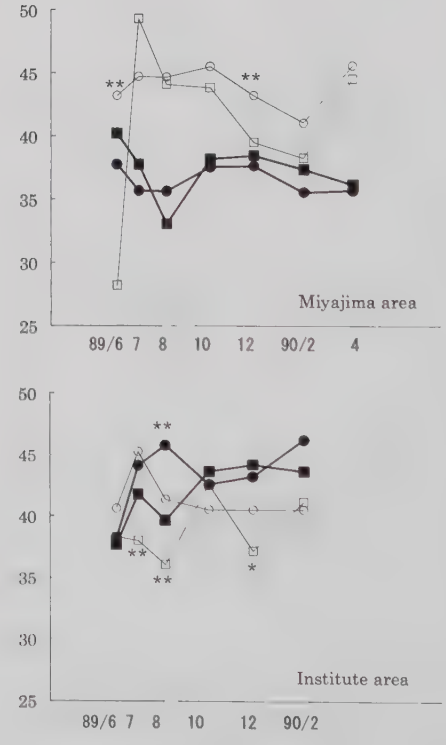


Fig. 40. Swell index-2
Swell index - 2=SW×200／(SH+SL)

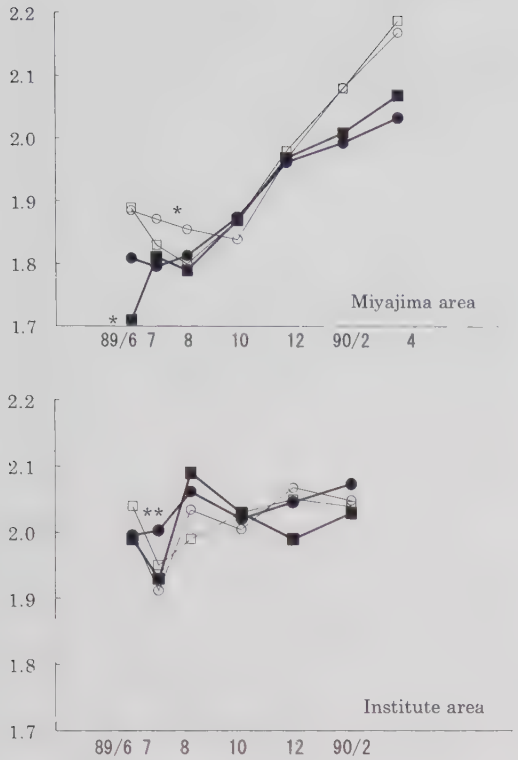


Fig. 41. Shell density

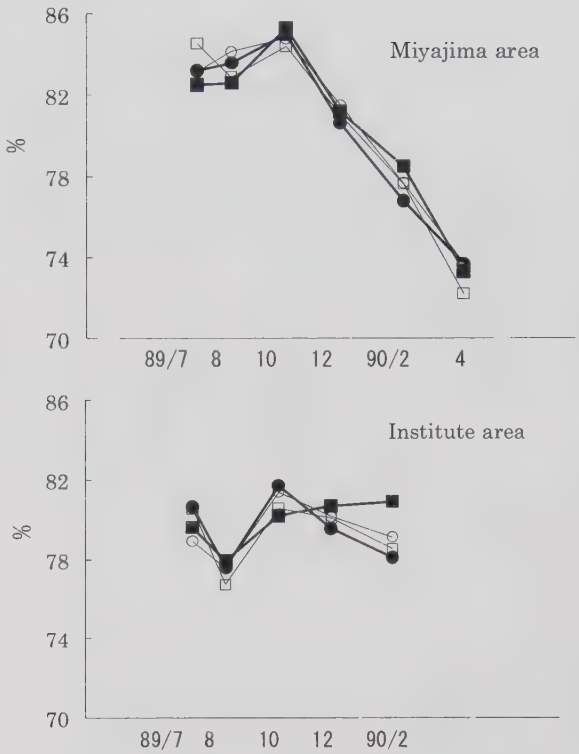
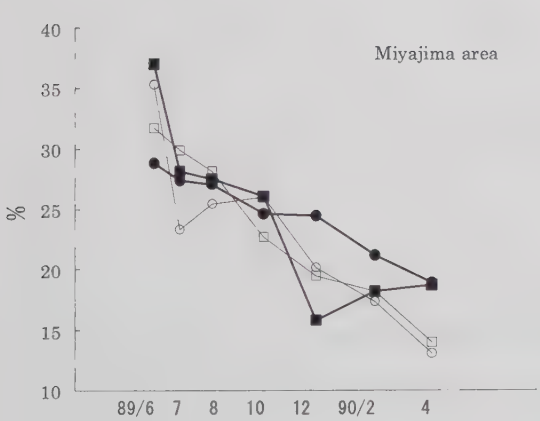


Fig. 42. Water content of flesh



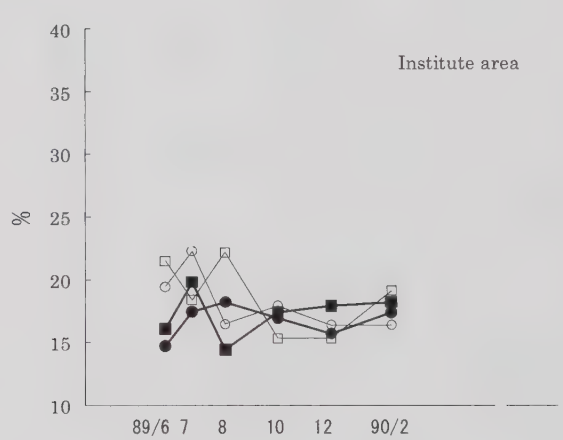


Fig. 43. Water content of shell

Table 8. Results of statistical tests for differences of shell density between upper and lower layers in the Miyajima area

	Jun	Jul	Aug	Oct	Dec	Feb	Apr
Miyagi	—	—	—	—	—	**	**
Hiroshima	—	*	—	—	—	**	**

** ; significant at the 1% level, * ; significant at the 5% level. *t*-test or Welch's method was employed according to significance of the difference between population variances.

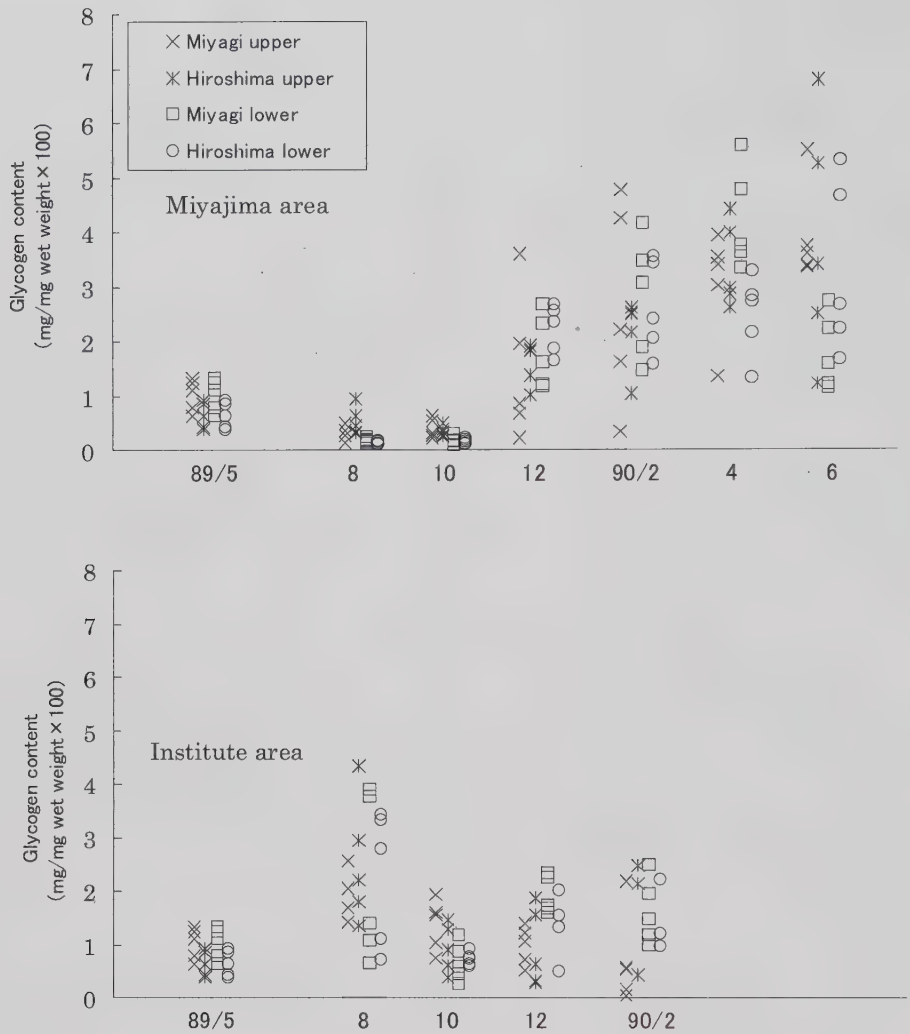


Fig. 44. Glycogen content of digestive gland. Each symbol denotes one specimen.

第2章 近縁種との交配特性

稲葉(1993)は日本産カキ目録の中で*Crassostrea*属のカキとして

Crassostrea gigas (Thunberg, 1793)
マガキ (方言) 全国各地
Crassostrea ariakensis (Wakiya, 1929)
スミノエガキ (藤田) 有明海
Crassostrea nippona (Seki, 1934)
イワガキ (関) 陸奥以南
Crassostrea iredalei (Faustino, 1932)
ミナミマガキ (波部) 南シナ海以南

の4種を挙げている。

日本産のマガキ属についてはこれまでに形態，タンパク泳動に基づいた分類やアイソザイム分析に基づいた類縁関係の検討が行われてきた(Torigoe, 1978; Buroker *et al.*, 1979a; Buroker *et al.*, 1979b; Torigoe, 1981; Ozaki and Fujio, 1985)。しかし，有明海のカキ類のなかで沼知 (1971) が示した分類学的に識別困難な集団や，Amemiya (1928) が示したシカメについてはこれらの検討のなかでも充分に扱われず詳細が依然として明らかではないため，遺伝資源としての系統の識別や人工種苗生産での親貝の選択時の混乱が危惧される。

シカメとは，もともとAmemiya(1928)によりマガキの一変種 (*Ostrea gigas* var. *sikamea*) とされたカキである。Amemiyaによれば佐賀県有明湾の浅所泥底に普通にみられる矮小型のカキで，殻はよく皺がより，殻表には深い葉状構造が発達し，凹凸の多い様相を呈するとされる。4 cm近くまで成長し，マガキよりもやや低い塩分環境まで分布し，潮間帯での分布の中心はマガキよりもやや高い位置にあるという。成長が遅い

ことから国内では産業的には注目されず，またその後の動物命名規約の改正により変種が正式な階級として扱われなくなったことも影響し，Amemiya以降国内でシカメに関する研究は充分に行われてこなかった。

沼知（1971）は有明海産のマガキと思われる雄ガキには他産地産マガキ卵をよく受精する精子をもつ個体（B型♂）と全く受精しない精子をもつ個体（A型♂）があり，雌もA型♂とよく受精する卵をもつ個体（A型♀）と全く受精しない個体（B型♀）が存在することを指摘し，有明海のカキの様態が単純ではないことを示唆したが，Imai and Sakai(1961)の交配実験ではこのようなカキの存在は示されず，有明海には各地のマガキとよく交配するマガキが分布するものと考えられていた。また，その後のOzaki and Fujio（1985)によるアイソザイム分析でも，A型のカキが分析サンプルに含まれていなかった可能性は述べられつつも，熊本産を含む国内のマガキ地方集団間の遺伝的差異は小さいとされ，国内では日本のマガキ地方集団は地理的に勾配を持って連続した集団であると認識されるようになった。

一方，欧米でのシカメに対する認識は日本とは異なっていた。アメリカ合衆国西岸では1940年代後半に熊本県の八代海から輸入されたカキの中でマガキとは成長速度などの特性が異なり大きくならないカキが「Kumamoto oyster」という系統として保持され，乱獲と環境変化により激減したOlympia oyster（*Ostrea lurida*)の代用品腫として珍重されてきた。

このような背景のもと，Ahmed(1975）は日本産マガキの分類に関する過去の研究やマガキの染色体構造に関する自らの研究の結果から，熊本産のマガキを*C. sikamea*として日本国内のマガキの他の地方集団とは別種とすることを提案し，続いてBuroker *et al.*(1979a)は熊本，広島，宮城のマガキ地方集団のアイソザイム分析による遺伝的距離をもとに，熊本の個体群はマガキとは別種（*Crassostrea sikamea*）にすべきであると述べ，欧米では熊本の地方集団＝Kumamoto oyster＝シカメ(*Crassostrea sikamea*)であると見なされるようになった。

その後，Robinson(1992）によりKumamoto oysterの成熟特性がマガキと異なることが示されたが，依然として形態的な特徴からの識別は困難と言われていた。程なくしてBanks and Hedgecock (1993a)はマガキとKumamoto oysterのミトコンドリアゲノムに存在する16SrRNA遺伝子の塩基配列を解析した結果，両カキとも各々単一のハプロタイプを有し，両カキ間では7塩基の置換が起こっていることを示した。彼らはこの差に基づき両カキに特徴的な塩基配列に基づいたプライマーを作成してフラグメント解析による両カキの判別手法を開発し，両カキが高い信頼性で識別できるようになった。さらにHedgecock *et al.* (1993)は，沼知（1971）が有明海のマガキで既に見いだしていたA型のマガキと同様Kumamoto oysterの精子でマガキ卵を受精できないことを示し，マガキとKumamoto oysterの間にある程度の生殖的隔離が存在することを証明した。

一方でBanks *et al.*(1994)はアメリカのKumamoto oysterの16S r RNA遺伝子と同じフラグメント型を示す個体を熊本県から採取したカキで見出せず，日本のシカメの消失が危惧されるに至った。

現在，広島県，宮城県および岡山県など主なカキ養殖県の水産試験場では選抜育種等によるマガキの育種に関する研究が行われている。これらの研究のうえで育種素材となる基礎集団にどのようなカキを用いるかということは，育種の効果を決定しかねないほどの重要な問題である。特にマガキ，シカメ，スミノエガキが混生する有明海に注目した場合，マガキ基礎集団と近縁種との交雑個体の有無など，天然カキ資源の遺伝的背景を明らかにすることが必要である。また，シカメを系統保存してきたアメリカでは1980年代までにマガキとの交雑が進んでしまい（Quayle, 1988)，Banks *et al.*(1994)が述べているようにあらためて原種の探索が必要とされている。このように，確実な系統保存の観点からも交雑種の識別方法や遺伝的特性を知ることは重要と考えられる。

本章では，マガキと非常に近縁であるといわれているシカメを中心に分子生物学的手法に基づいて有明海での生息の有無を確認するとともに，マガキとシカメのミトコンドリアDNAに存在する16SrRNA遺伝子，核DNAに存在するCalmodulin遺伝子の第3イントロン領域の制限酵素切断片長の多型に基づいた交配実験を実施し，初期発生から稚貝にいたる特性を調査することにより，シカメとマガキの間の交配特性および交雑個体の遺伝的特性を検討する。

2-1．DNA解析によるシカメの確認

方　　法

1996年3月に佐賀県鹿島市の六角川河口域（st. 1)で，大潮の干潮時にカキ類を採取した（Fig. 45)。これらの地域にはマガキの他にスミノエガキやシカメが棲息しているといわれている。地元ではスミノエガキは「ひらがき」と呼ばれ他のカキと区別されるが，シカメとマガキは特に区別されず「しかめ」と総称されている。これらのカキを南西海区水産研究所に持ち帰り，殻高がほぼ5 cm以下の小型のカキ88個体をmtDNAに

ある16SrRNA遺伝子と核DNAにあるCalmodulin遺伝子の第3イントロン領域（以降，CaM intron 3と略記）の分析用に供した。

また，1998年5月には，佐賀県鹿島市の鹿島川河口から約1km上流にあるコンクリート桟橋の岸壁（st. 2），佐賀県鹿島市飯田の天然岩礁(st. 3)，長崎県北高来郡小長井港の付近にある桟橋の岸壁（st. 4）の各採集地点(Fig. 45)で，大潮の干潮時に海底の泥面から15～90cmの高さにかけて15cm間隔で稚貝サイズのカキを採集した。鹿島川桟橋の壁面は河川水の影響を強く受けるとともに大規模な干潟の奥部にあたり，飯田七浦は河口に近く大規模な干潟もある海域，小長井は河口から離れ河川水の影響も比較的弱いとともに大規模な干潟も無い場所である。これらのカキの種類を判別するため，各地点の各高さあたり16～24個体をBanks and Hedgecock (1993)の方法および浜口ら（未発表）の方法に基づいて16SrRNA遺伝子の分析に供した。

さらに，1997年3月および2000年3月に鹿島川河口域で採取したカキについて，殻高がほぼ5 cm以下と小型にもかかわらず成長脈が密で殻表面がよく摩耗しているなど，外観から成長が遅いと推察されるカキを選別して16sRNA遺伝子とCAM intron 3の分析に供した。

これらのカキは洗浄後右殻を取り除き，鰓の小片を切り出して未固定のままもしくは95%メタノールで固定してDNA解析に供した。DNAの抽出はQiamp DNA mini Kit(Qiagen)を用いて添付のマニュアル通りに行った。

ミトコンドリアDNAの16SrRNA遺伝子領域はPCRによって増幅した。プライマーはBanks and Hedgecock (1993)が用いたもの，すなわち5'－CCGGCCGCCCTAGCGTGAGGG－3'および5'－ACTCAGAAAGGTTAGGCTTAC－3'を用いた。PCRには25 μLあたりに鋳型DNAを10～50ng，ExTaqポリメラーゼ（TaKaRa）を1.25unit，2.5 μLの10XexTaq buffer，各プライマー50pmol，各dNTPを0.2mM，$MgCl_2$を2 mM含む反応液を用いた。サーマルサイクラー（PC-800，Astec）により，最初の熱変性は94℃で2分30秒，ついで94℃で30秒，55℃で30秒，72℃で30秒の反応を35回繰り返し，最終伸長反応は72℃で5分としてPCRを行った。増幅したDNAはTBE（89mM Tris-borate，89mM boric acid，2 mM EDTA）buffer中で0.2ng/mLの臭化エチジウムを含む3%アガロースゲル（SeakemGTG，FMCbioproducts)で電気泳動し，紫外線を照射してバンドを確認した。246bp付近に1本のバンドが現れるものをシカメ型のmtDNA，バンドが現れないものをマガキ型のmtDNAを持つ個体であると判定した。

核DNAではCôrte-Real *et al.* (1944)の方法を参考に，CaM intron3に特異的に対応するプライマー5'－CGAGGTCGATGCTGATGGTAAG－3'および5'－GGAATGAGAATGTGTTGGTTTG－3'を設計した。25 μlの反応液中には鋳型DNAを10～50ng，ExTaqポリメラーゼ（TaKaRa）を1.25unit，2.5 μLの10XexTaq buffer，各プライマー50pM，各dNTPを0.2mM，MgCl2を2 mM含んだ。この反応液を上記サーマルサイクラーを用い，最初の熱変性は94℃で2分30秒，ついで94℃で45秒，61℃で30秒，72℃で1.5分の反応を35回繰り返し，最終伸長反応は72℃で5分としてPCRを行った。増幅したDNAはTBE（89 mM Tris-borate，89mM boric acid，2 mM EDTA）buffer中で0.2ng/mLの臭化エチジウムを含む1%アガロースゲル(SeakemGTG,FMCbioproducts)で電気泳動し，紫外線を照射してバンドを確認した。

稚貝のCaM intron 3の型について，向井(1978)によりHardy-Weinberg平衡のカイ二乗検定を行った。

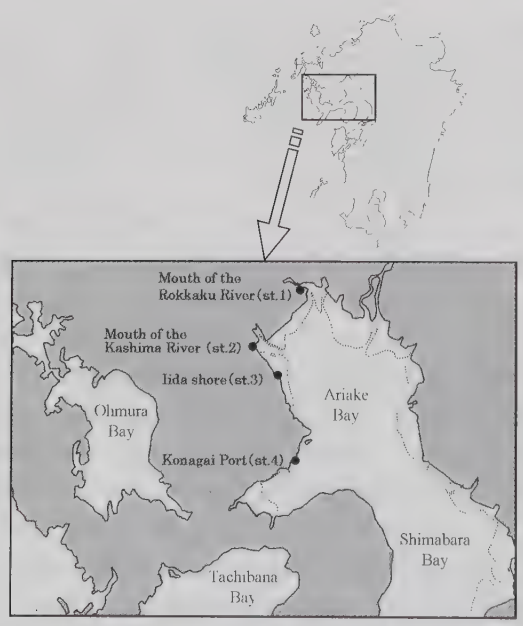


Fig. 45. Sampling points in Ariake Bay

結　果

有明海六角川河口のst. 1で採取した小型のカキのなかに，シカメ型の16SrRNA遺伝子型を示す個体が確認された16SrRNA遺伝子の増幅がみられなかった個体（以下，mtマガキ型カキ）については，CAM intron 3はすべて同一の位置に1本のバンドが現れた。一方，16SrRNA遺伝子がシカメ型を示した個体（以下，mtシカメ型カキ）のCAM intron 3は，

A. マガキと同じ位置に1本のバンドが現れる個体
B. マガキよりも軽い位置に1本のバンドが現れる個体
C. AとBのバンドが同時に現れる個体

の3通りに分かれた。ここではこれらCaM intron 3の

増幅断片について，マガキではマガキホモ型（gg）だけが存在し，mtシカメ型カキではシカメホモ型（ss），マガキホモ型（gg）およびハイブリッド型（gs）が存在するものと仮定して以後の議論を進めることにする。mtシカメ型カキのCAM intron 3 の各型の頻度分布をFig. 46に示した。

鹿島川以南のst. 2 ～ 4 ではシカメは全ての採集地点で確認された。スミノエガキはst. 2 だけで確認され，また，泥面に近いほど出現率が大きかった。シカメはst. 3でもっとも多く，スミノエガキとは逆に泥面に近いほど出現率が低下し，st. 4では泥面から30cm以下では出現しなかった。マガキも全ての採集地点で認められるがst. 4で特に出現率が高く，st. 2以外では泥面に近いほど出現率が高い傾向があった（Fig. 47）。このように，これら 3 種類のカキは採集地により出現率が大きく異なり，また，特にst. 2では泥面からの距離にも大きな影響を受けた。

鹿島川河口で採取し，Amemiya（1928）の示す殻の外観に基づいてシカメである可能性が高いと判定したカキについて16SrRNA遺伝子を分析した結果，1997年に採取したカキでは87%がmtシカメ型カキであり，マガキの混入率は13%であったが，2000年に採取したカキでは全てがmtシカメ型カキであった。1996年に六角川河口域で採取したカキ同様，mtシカメ型カキのCaM intron 3 イントロンにはシカメモホ型(ss)，マガキモホ型(gg)，ハイブリッド型(gs)がいずれも20%以上の割合で出現した（Fig. 48）。

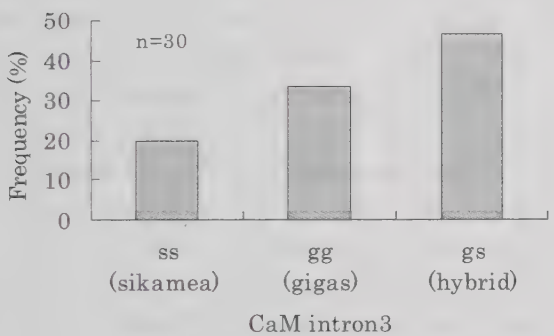


Fig. 46. Frequency of each type of CaM intron3 of oysters having sikamea type 16SrRNA gene, collected at the mouth of the Rokkaku River (st.1). All specimens that showed gigas type 16SrDNA (58 individuals) had gigas type CaM intron3 (gg). Hypothetical names for types of CaM intron3 are shown in parentheses.

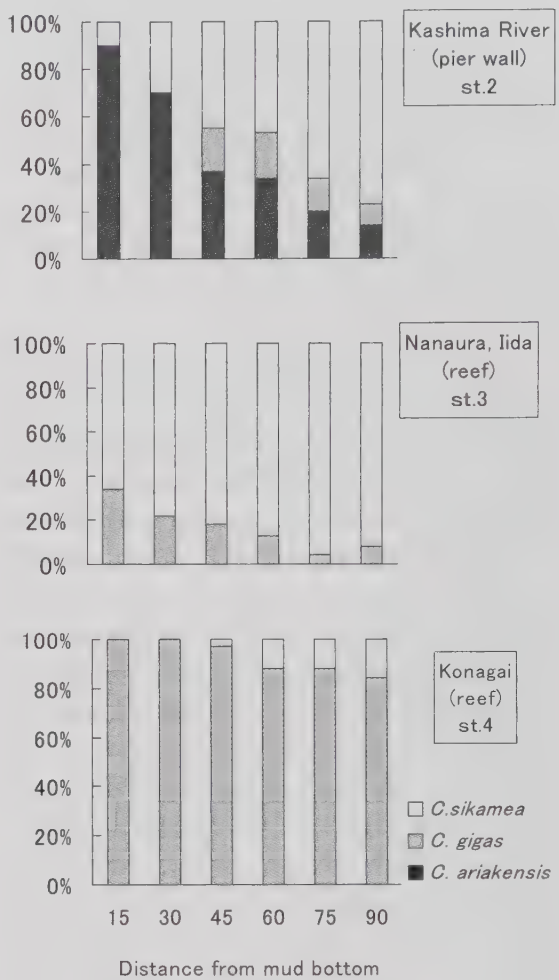


Fig. 47. Frequency of *C. gigas, C.sikamea* and *C. ariakensis* on the west side of Ariake Bay. Oysters less than 5 cm in shell height were used

Table 9. χ^2 tests for Hardy-Weinberg equilibrium of CaM. intron3 type of the oysters having sikamea type 16SrRNA gene, collected at the mouth of the Rokkaku River

CaM intron3 type		Observation	Expectation
Gigas (homozygote)	gg	10	9.6
Hybrid	gs	14	14.7
Sikame (homozygote)	ss	6	5.6

Frequency of g gene (p)：0.567, F requency of s gene (q)：0.433.

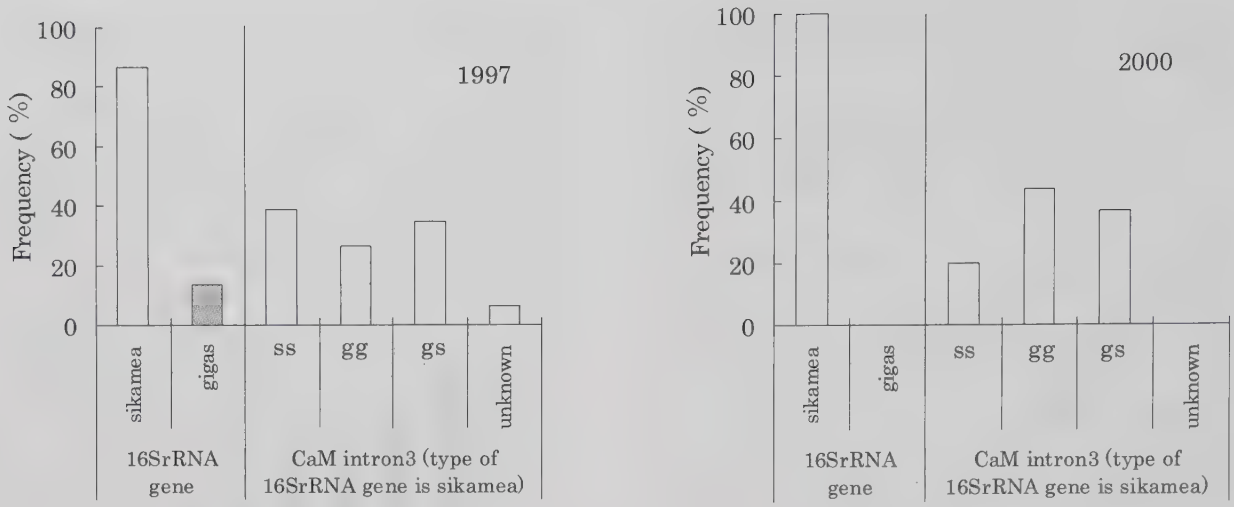


Fig. 48. DNA type frequency of oysters collected at the mouth of the Kashima River. Oysters judged as "sikamea" by external characteristics were used.

考　察

rRNAをコードするDNAは種々の生物で系統解析に利用されている（岩槻, 馬渡, 1996; Canapa *et al.*, 1999)。本研究ではBanks and Hedgecock（1993)の手法を用い，有明海北西部にあたる佐賀県六角川河口域以南に，16SrRNA遺伝子がシカメ型であるカキが存在することを確認した。外観からシカメである可能性が高いと判断したカキが実際に16SrRNA遺伝子がシカメ型である確率は87%以上であったが，成長段階による難易や個人差も想定され，外観からだけでこれらを確実に選別するのは困難と思われた。16SrRNA遺伝子がシカメ型を示すカキのなかにマガキとの自然交雑体を示唆するCaM intron 3 型が得られたことから，本研究ではこれ以降も16SrRNA遺伝子がシカメ型のカキ＝シカメとはせず，「mtシカメ型カキ」という呼称を用いることにする。

スミノエガキは有明海湾奥部の各河川澪筋の低潮線付近に分布し（佐賀県, 1985)，成貝はマガキやシカメの成貝よりも平たく大型化するため大きさが分類の目安の一つになるが，岸壁に混生している稚貝サイズの貝を見分けることは困難である。遺伝子解析による判別はこのような場合にも威力を発揮する。本研究でスミノエガキの生息が唯一確認されたst. 2の護岸は澪筋にそった干潟の奥部に位置し，他の採集地点に比較して河川水の影響が特に強い。今回，採集地点の環境調査は行っていないが，st. 2では潮汐による環境水の流動速度が河口外に比べ大きいと考えられ，それにより底層の懸濁物の巻き上げも盛んであることが推察され，また，干潮時には河川水に直接晒されやすい。スミノエガキでは各発生ステージの摂餌特性や塩分耐性などに関連してこのような環境条件が再生産の維持のために必須であると思われる。一方，マガキとシカメは全ての採集地点で確認されスミノエガキよりも広い環境耐性をもつと考えられるが，沖合いに大きな干潟が存在しないst. 4ではシカメの出現率は低く，シカメは何らかの形で干潟に依存している可能性が考えられた。マガキはst. 4で優占し，スミノエガキやシカメに比較して河川水や干潟の影響があまり強すぎない環境を好むと思われた。

米国でシカメ*C. sikamea*と見なされているカキは，かつての入手先が熊本県であったためKumamoto oyster と命名された。おそらくこの経緯にもとづき，Buroker *et al.* (1979)やBanks *et al.* (1994)はKumamoto oysterの原種を探索するために熊本県で採取されたカキのアイソザイム分析やmtDNA解析を行っている。特にBuroker *et al.* (1979)の論文では，地名はKumamotoとしか記されていないが，採集地を示した地図から判断すると有明海ではなく宇土半島を隔てた不知火海側のカキを用いたと思われる。しかし，Amemiya (1928)による原記載ではシカメは佐賀県有明海に産するとされている。熊本からアメリカに輸出されたカキの中には佐賀県有明海で採取されたカキが含まれていたものと思われ，河川の影響を強く受ける有明海北部海域にシカメの分布が限定されているとすれば，Buroker *et al.* (1979)やBanks *et al.* (1994)が用いた熊本県産カキが採集された地点にはもともとシカメが生息していなかった可能性もある。また，詳細は明らかではないが，河口沿岸域に沿って採集した限りで

は，外観がシカメ型を示す個体は河口域に一様に分布するのでは無く，沼知（1971）が述べているようにパッチ状に分布していて，採集地点が少ない場合は採集し損なう可能性が大きいと思われる。

Amemiya（1928）は有明海に生息するカキの垂直分布について，シカメとマガキは高潮線から低潮線まで分布するがスミノエガキは低潮線付近に限られると述べ，また，シカメの方がマガキよりもやや高い位置に分布の中心があることを示している。本研究で3種類の稚貝が確認できたst. 4ではスミノエガキとシカメは全ての高さで出現したが，マガキは泥面から15〜30 cmでは確認できず，Amemiyaの指摘とはやや異なった。しかし，16SrRNA遺伝子での分類は行っていないものの，干潟上の成貝は確かにスミノエガキがもっとも低い位置に分布が限られる一方，マガキはより広い垂直分布を示し，成長段階や付着基質により分布範囲が異なることも考えられた。

現在有明海は人為的環境改変が生物資源に与える影響について注目を浴びている海域の一つであり，シカメやスミノエガキの様に干潟に強く依存していると思われるカキの遺伝資源は埋め立てや流路変更など各種の環境改変により存亡の危機に立たされる可能性が強い。今後は，有明海全般にわたり，3種類のカキの幼生，稚貝，成貝の各成長段階での分布特性についてDNA解析技術を用いてより詳細に調べ，環境特性との関連を検討する必要がある。

真核細胞生物に広く分布するcalmodulin遺伝子のintron領域は高度に保存されており，魚類では複数種のcalmodulin遺伝子第4 intron領域を増幅できるユニバーサルプライマーが開発されている（Chow, 1998）。二枚貝類についてCôrte-Real *et al.*（1994a）は*Mytilus* sp.の混生海域のサンプルを用いてcalmodulin遺伝子は少なくとも2個存在するとしたうえで，そのうちの片方の遺伝子に特異的なプライマーによりCaM intron 3に2種類のalleleを認めている。本研究ではCaM intron 3のPCR産物はマガキでは単一のバンドだけであったのに対し，mtシカメ型カキではマガキと同一のバンドを示す個体，これより軽い単一のバンドを示す個体，これら2つのバンドを示す個体，が現れた。本研究でCaM intron 3を増幅するために用いたプライマーは特異性が高く，もしcalmodulin遺伝子のコピーが複数存在していたとしても，そのうちの一つの遺伝子座のintron 3だけを増幅している可能性が高いため，現れたバンドは2種類のalleleのホモ接合型とヘテロ接合型であると考えられる。

過去の研究例では，室内での交配実験ではシカメ♂×マガキ♀の組み合わせでは交雑しないが，マガキ♂×シカメ♀の組み合わせは交雑すると言われている。これまで天然海域でのマガキとシカメの自然交雑を確認した例は無いが，米国オレゴン州Yaquina湾の例では雌の成熟のピークがマガキが7〜9月である（Lannan *et al.*, 1980）のに対しシカメ（*Crassostrea gigas* kumamoto）は8〜10月であり（Robinson, 1992），重なり合う期間が十分あることから，有明海でも自然交雑が起こる可能性は否定できない。もし，本来シカメがマガキとは異なるCaM intron 3のalleleだけを持っていたと仮定すると，本研究で確認されたCaM intron 3のバンドの出現状況は自然雑種が存在する場合の出現状況と矛盾しない。さらに，成熟した雌雄の交雑種間で受精が可能であるなら，これによりmtDNAがシカメ型でありながら一部の染色体対が完全にマガキに由来する個体が生じる可能性もある。一方，マガキ♂×シカメ♀の交雑が起こっているとすると，マガキ型のCaM intron 3 alleleがシカメ個体群へ流入することによりHardy-Weinberg平衡が成り立たなくなることが予想されるが，外観によるシカメとマガキの選別を行わなかった六角川河口ではこの様な不平衡は認められなかった（Table 9）。

今回遺伝子解析によって識別されたmtシカメ型カキの分類学上の位置については遺伝子解析以外の手法も含めさらに検討する必要があるが，少なくともアメリカに現存する系統のもととなったと思われる個体群が今なお有明海に現存することが確認され，マガキとの自然交雑個体が存在する可能性が示唆された。

2-2．mtシカメ型カキとマガキの交配

前節では，有明海に生息し16SrRNA遺伝子がシカメ型であるカキのCaM intron 3について，シカメ型，マガキ型およびハイブリッド型と推定される個体が存在することを示した。これらの型がマガキとmtシカメ型カキの交雑により生じることを証明し，有明海のカキの遺伝資源としての動態を解析するためには，マガキとCaM intron 3各型のmtシカメ型カキを室内実験で交配させて交配特性を調べるとともに，得られた稚貝について，メンデル遺伝から期待されるDNA型が得られるかどうかなどを調査する必要がある。このため1997年7月（1997年交配群）および2000年6月（2000年交配群）に広島産マガキ，有明産マガキ，およびmtシカメ型カキを用い，下記により交配実験を行った。交配実験に用いる親貝のDNA型を調べる過程で，CaM intron 3についてこれまでの調査でCaM intron 3がシカメホモ型である個体に認められた1本のバンドに加えて，これとは異なりマガキホモ型とも異なるもう1本のバンドを持つ個体が新たに確認された。以後，

CaM intron 3 のシカメ型について，これまでのものをシカメ1型（ss），新たに確認された2本のバンドを持つものをシカメ2型（ss'）と呼ぶ事にする（Fig. 49）。なお，マガキのCaM intron 3 の塩基配列では，gよりもsは約74bp，同じくs'は約56bp塩基数が少なくなっており，塩基配列の欠損によりこれらの差が生じたと考えられている（浜口 未発表）。

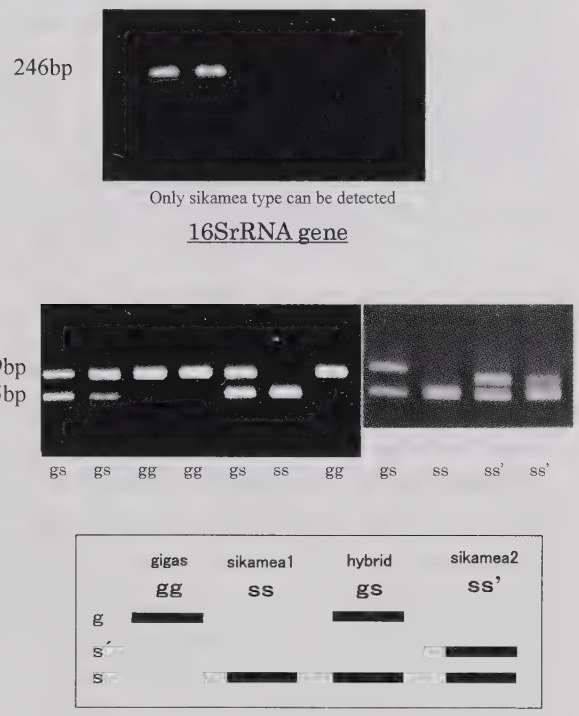


Fig. 49. Electrophoretic patterns of PCR products from 16SrRNA gene and CaM intron3

以後，記載の簡略化のため，それぞれのDNA型の個体は下表の略称にしたがって記載した。

ミトコンドリアの16SrRNA遺伝子の型	核のCaM intron 3 の型		略　称
マガキ *gigas*	マガキ *gigas*	gg	マガキ（有明産，広島産） *gigas*
シカメ *sikamea*	シカメ1 *sikamea*1	ss	シカメ・シカメ1 *sikamea*・*sikamea*1
	シカメ2 *sikamea*2	ss'	シカメ・シカメ2 *sikamea*・*sikamea*2
	ハイブリッド hybrid	gs	シカメ・ハイブリ *sikamea*・hybrid
	マガキ *gigas*	gg	シカメ・マガキ *sikamea*・*gigas*

方　法

交配は1997年7月および2000年6月に行った。各年の3月に有明海北西部の塩田川河口で採集後南西海区水産研究所地先でカゴ養成したカキの中から，前述した外観に基づきmtシカメ型カキの可能性が高いと思われるカキと，これより大型で明らかにマガキと思われる個体を親貝候補として選んだ。また，1997年の交配では広島湾内の大野瀬戸で採集したマガキも親貝として用いた。これらのカキは洗浄後に右殻を取り除いたうえ外観的に生殖巣の発達状態が悪いものは除外し，軟体部表面を軽く圧迫することにより尿生殖腔から採取した微量の卵や精子を検鏡して雌雄を確認した。さらに各個体の鰓の一部を採取して前述の方法で16SrRNA遺伝子およびCaM intron 3 の型を判定した。同一のDNA型を示す個体のうち，生殖巣の外観および検鏡結果からもっとも受精に適していると思われる雌雄1個体ずつを選び親貝とし，交配を実施した（Table 10）。卵と精子は切開法で採取し，卵はオープニング100 μm，精子は同20 μmのプランクトンネットでそれぞれ濾してきょう雑物を除いた。卵濃度を250～450個/mL，精子濃度を1.5×10^5～1.5×10^6個/mLの範囲として300mLビーカー中で一対交配により媒精した。卵および精子の計数にはCoulter Multisizer II 型（Coulter社製）を用いた。洗卵は3回行い，媒精約2時間後に固定した卵について各区とも250個以上を計数し，2細胞～多細胞の発生卵が占める割合を分裂率とした。また，2001年交配組については海水中へ切り出して1時間以上経過して充分吸水させた未受精卵の卵径をCoulter Multisizer II 型により計測した。媒精約8時間後に海水表面に浮出している幼生をガラスピペットで静かに採取し，マガキ♀由来の幼生は天然濃度海水中に，mtシカメ型♀由来の幼生は蒸留水で3/4に希釈した海水中にそれぞれ収容して飼育を開始した。1997年交配群の飼育密度は得られた幼生数に応じて3.5～8.5個/mLとした。2000年交配群については多数の交配区を設けるため受精には小型の容器を用いたこと等により，全体的に得られた浮遊幼生数が少なかったため，飼育開始時の各交配区の幼生密度は7個/mLを上限としただけで各区が同一になるようには調整しなかった。飼育2日後からはmtシカメ型♀由来の幼生の飼育海水はRobinson(1992)に基づきさらに濃度を下げ2/3濃度海水を用いた。幼生飼育には4Lガラスビン（水量3.5L）を用い，エアレーションの飛沫により幼生が近くの瓶へ混入しないよう，換水時（エアレーションは停止）以外は全ての容器に蓋をして飼育した。媒精24時間以上経過後の幼生のうち，殻が形成されヒンジ部がほぼ直線的で周縁部等にも歪みが無いものの割合を正常D

型幼生率とした。1997年交配群は飼育開始9日目で飼育を中止した。

幼生飼育中は約30～60mL/minのエアレーションを行い，2～4日に一度の割合で全換水を行った。餌料には*Pavlova* sp. および*Chaetoceros* sp. を用い，幼生の成長段階と残餌量に応じて0.5～3万cells/mLの濃度となるよう1日1～2回投与した。飼育水中の餌料濃度はCoulter Multisizer Ⅱ型を用いて計数した。着底期にはシングルスパットによる採苗を目的としてカキ殻砕片を容器の底に敷いた。着底期後以降は上記餌料の他*Tetraselmis* sp. を適宜与えた。

卵や幼生の固定にはパラフォルム・グルタールアルデヒド固定液（Karnovsky modified by Zambrano）を用い，固定後は10℃以下の冷蔵庫中で保存した。海水は全て0.2μmのカートリッジフィルターで濾過したものを用いた。媒精および幼生飼育時の海水の水温は24±1℃，未希釈海水の塩分は30～32であった。

2000年交配群では着底期前の受精後11，18日目と着底期～着底期後の39日目の幼生について雄親と雌親の違いが生残率に与える影響を解析するため，二元配置法による分散分析を行った。このとき，シカメ2型の雌雄に関する数値はデータが揃っていないため除外した。

飼育開始6ヵ月後の稚貝数を幼生収容時の正常D型幼生数で割った値を「稚貝生産率」として算出した。これらの稚貝の一部について前項と同様の方法でDNA型を調べて親貝の遺伝子型を推定し，各型の遺伝性を検討した。

結　果

2001年交配群の未受精卵の卵径分布を調べると，mtシカメ型カキの卵はCaM intron 3の型にかかわらず全て47μm付近にピークのあるよく似た分布を示す一方，有明産マガキは55μm付近にピークのあるすその広い分布を示した（Fig. 50）。

mtシカメ型カキ♀の卵は用いた精子に関わらず分裂率，正常D型幼生率ともに80%以上の高い値を示した。一方，従来受精しないとされていたマガキ♀×mtシカメ型カキ♂の組み合わせでも最高で5.7%の分裂率を示し，正常D型幼生率は対象区であるマガキ♀×マガキ♂と同様に70%以上の値を示した（Table 11, Fig. 51）。

1997年交配群では4～6日目にかけてシカメ・シカメ雌由来の幼生が雄親の種類に関わらずいずれも共通して急激に減少した（Fig. 52）。このため，1997年交配群については飼育開始9日目で実験を打ち切った。

2000年交配群について，飼育開始11日目の生残率の二元配置分散分析では雄親，雌親の因子とも5%の水準でも有意では無かったが，18日目では雄親，雌親の因子とも5%以上の水準で有意であった（Table 12, Table 13）。この時点では雌親の違い，雄親の違い双方に影響を受けていると思われ，個別にみてみると雌親についてはシカメ・ハイブリで生残率が高く，マガキで低い傾向を示したが，雄親ではこれとは逆にマガキで高く，シカメ・ハイブリで低い傾向を示した（Fig. 53）。飼育開始21日目に付着基質を投入したが，この時点ではまだいずれの実験区でも幼生の付着は認められ

Table 10. Combination of parents for crossbreeding

Crossbreeding in 1997

♀ \ ♂	*gigas* (Hiroshima)	*gigas* (Ariake)	*sitamea*・*sikamea*1	*sikamea*・*gigas*
gigas(Hiroshima)	B	B	×	×
gigas(Ariake)	B	B	×	×
sikamea・*sikamea*1	B	B	B	B
sikamea・*gigas*	B	B	B	B

Crossbreeding in 2000

♀ \ ♂	*gigas* (Ariake)	*sitamea*・*sikamea*1	*sitamea*・*sikamea*2	*sikamea*・hybrid	*sikamea*・*gigas*
gigas(Hiroshima)	B	b	−	b	b
gigas(Ariake)	B	B	B	B	B
sikamea・*sikamea*1	B	−	B	−	−
sikamea・*gigas*	B	B	−	B	B
sikamea・*gigas*	B	B	−	B	B

B：Larvae were cultured in 4L glass bottle, b：Larvae were cultured in 500ml glass beaker,
×：Larvae were cultured. −：Not crossbred.

なかった。飼育開始39日目幼生の生残率の二元配置分散分析では，雄親，雌親の因子とも有意ではなく，全体的には親の違いの影響を受けているとは言えなかった（Table 14）。しかし個別に見るとマガキを雌親とした交配組以外では20%以上の値を示す交配組が多く，幼生の付着が遅れているものと思われた。

また，従来受精しないと言われていたマガキ♀×mtシカメ型カキ♂の組み合わせからの幼生は他の組み合わせの幼生と比べて特に生残が劣ることは無かった。

飼育開始6ヵ月後の稚貝生産率は，シカメ・ハイブリの雌では例外的に同じDNA型の雄との交配でもっとも低い値を示すが，それ以外の雌では同じDNA型の雄との交配でもっとも高い値を示した。シカメ・シカメ1の雌では，同型またはシカメ・マガキ雄との交配と，それ以外の雄との交配で，稚貝生産率が大きく異なった。また，従来受精しないと言われていたマガキ♀×mtシカメ型カキ♂の交配組は他の交配組と比べ特に低い値ではなかった（Fig. 54）。

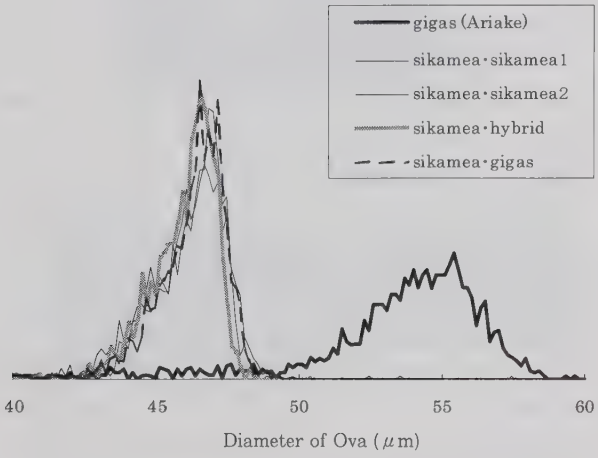


Fig. 50. Diameter of unfertilized ova at crossbreeding in 2000. More than 700 ova were measured for each female

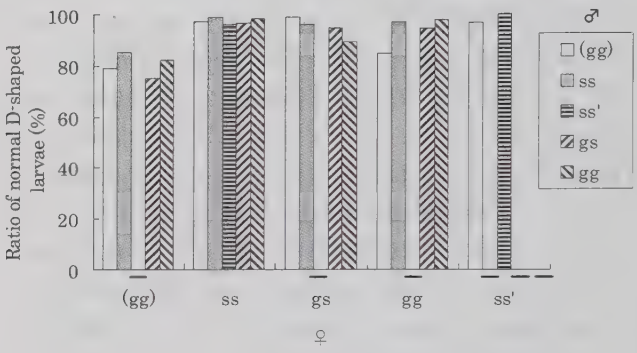


Fig. 51. Ratio of normal D-shaped larvae from crossbreeding in 2000. gg, ss, gs and ss' ; DNA type of CaM intron3 of parents having sikamea type 16SrRNA gene. (gg) ; Oysters having gigas type 16SrRNA gene (=*C. gigas*), collected in Ariake Bay. − ; not crossbred.

Table 11. Percent of ova developed in crossbreeding

Crossbreeding in 1997 unit;%

♀ \ ♂		*gigas* (Hiroshima) gg	*gigas* (Ariake) gg	*sikamea*·*sikamea*1 ss	*sikamea*·*gigas* gg
gigas (Hiroshina)	gg	98.5	99.1	0.0	1.0
gigas (Ariake)	gg	91.7	92.9	0.0	0.6
sikamea·*sikamea*1	ss	94.1	92.9	95.4	94.0
sikamea·*gigas*	gg	85.0	92.0	89.9	97.3

Crossbreeding in 2000 unit;%

♀ \ ♂		*gigas* (Ariake) gg	*sikamea*·*sikamea*1 ss	*sikamea*·*sikamea*2 ss'	*sikamea*·hybrid gs	*sikamea*·*gigas* gg
gigas (Ariake)	gg	98.2	5.7	−	2.7	3.5
sikamea·*sikamea*1	ss	94.1	93.5	92.0	94.1	94.9
sikamea·hybrid	gs	90.3	88.9	−	87.9	89.6
sikamea·*gigas*	gg	86.9	81.5	−	92.0	79.6
sikamea·*sikamea*2	ss'	95.2	−	94.0	−	−

gg, ss, gs, ss' ; types of CaM intron3. − ; notcrossbred

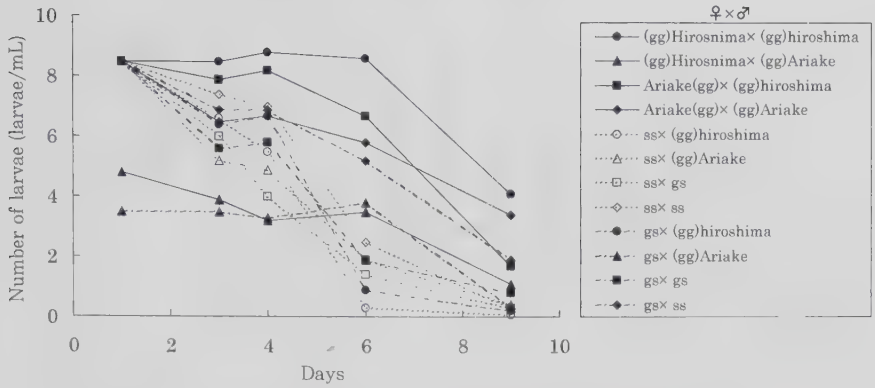


Fig. 52. Survival of larvae from crossbreeding in 1997

Table 12. Two-way ANOVA for survival rate of 11th day larvae in crossbreeding in 2000

Source	d.f.	SS	MS	F	p value	
Total	15	0.148868				
Female	3	0.02669	0.008897	1.34212	0.32091	−
Male	3	0.062519	0.02084	3.14384	0.07950	−
Error	9	0.059659	0.006629			

Table 13. Two-way ANOVA for survival rate of 18th day larvae of crossbreeding in 2000

Source	d.f.	SS	MS	F	p value	
Total	15	0.33561				
Female	3	0.07912	0.02637	5.80874	0.01724	*
Male	3	0.21563	0.07188	15.8301	0.00062	**
Error	9	0.04086	0.00454			

	♂	♀
(gg) : ss	−	**
(gg) : gs	**	**
(gg) : gg	−	−
ss : gs	−	−
ss : gg	−	*
gs : gg	*	**

** ; significant at the 1% level, * ; significant at the 5% level

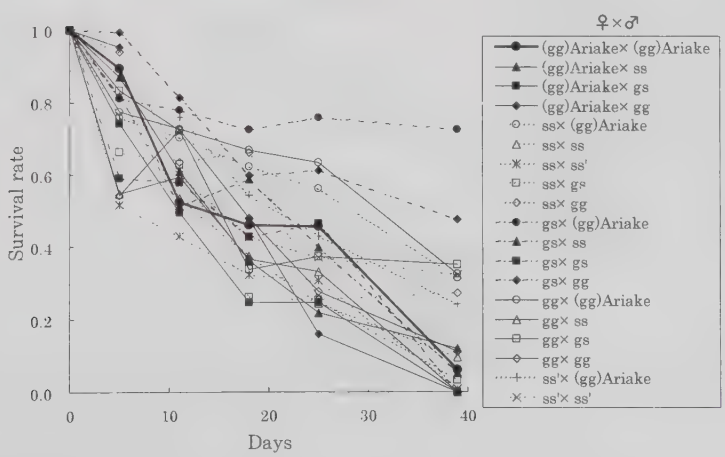


Fig. 53. Survival rate of larvae from crossbreeding in 2000

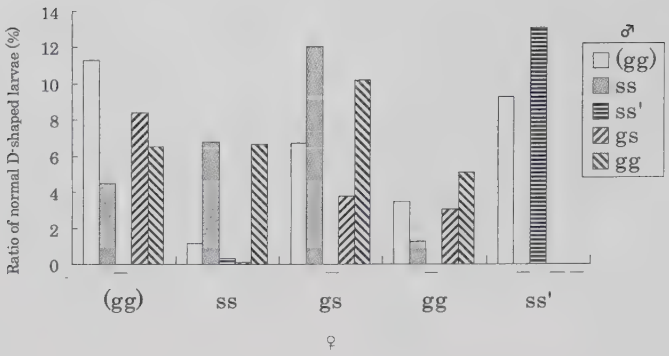


Fig. 54. Surival rate at 6 months after insemination from crossbreeding in 2000. Ratio of the number of 6 month juveniles against the number of D-shaped larvae. −; not crossbred

Table 14. Two-way ANOVA for survival rate of 39th day larvae of crossbreeding in 2000

Source	d.f.	SS	MS	F	p value	
Total	15	0.65572				
Female	3	0.14385	0.04795	1.41548	0.30094	−
Male	3	0.20699	0.069	2.03671	0.17927	−
Error	9	0.30488	0.03388			

Table 15. DNA type frequencies of juveniles produced by crossbreeding

unit; n

	Female	Male	Juveniles (6 months after insemination)							
			16SrRNA gene		CaM intron 3					
	Supposed CaM int3 type	Supposed CaM int3 type	*sikamea*	*gigas*	gg or gn	ss	ss'	s's'	gs	gs'
1	(gg)	(gg)		12	12					
2	ss	(gg)	12						12	
3	ss	ss	12			12				
4	ss	ss'	12			7	3			
5	ss	ga	12			2			9	
6	ss	gg	12						12	
7	ss'	(gg)	12		*6*				6	
8	ss'	ss'	12			3	9			
9	gs	(gg)	12		5				7	
10	gs	ss	12			8			4	
11	gs	ga	12		2	6			4	
12	gs	gg	12		7				5	
13	gn	(gg)	12		12					
14	gn	ss	12			7			5	
15	gn	ga	12		5	2			5	
16	gn	gg	12		12					
17	(gg)	(gg)		12	12					
18	(gg)	ss	*1*	11					12	
19	(gg)	ga	*1*	7	1				7	
20	(gg)	gg	*1*	9	10					

;DNA type expected to appear. *numbers in italic* ; DNA type not expected to appear
(gg) ; Oyster having gigas type 16SrRNA gene (=*C. gigas*)
※ The female used in these crosses were supposed to have a nondetective intron (n).

稚貝のDNA解析の結果とそれから推定される親のDNA型について，CaM intron 3では，シカメ・シカメ2のメスが関連する組み合わせ以外ではどの組み合わせでもメンデル遺伝から出現が期待される表現型が現れ，また 期待されない表現型は現れなかった(Table 15)。元来受精しないと言われていたマガキ♀×mtシカメ型カキ♂の組み合わせのうち，少なくともCaM intron 3がシカメ1型を示す雄を用いた交配では単為発生から生じる接合型は確認されず，これらは雌雄の前核が融合して発生したものと考えられた。

一方，シカメ2のメスからはメンデル遺伝から出現が期待される表現型が現われない例や期待されない表現型が現れる例がみられた。また，mtDNAについて，マガキ♀とマガキ以外の♂の組み合わせでは，少ないながら精子由来と思われるmtDNAの型が現れた。

考　　察

これまでマガキ卵×シカメ精子の組み合わせは濃厚な精子液を用いても全く発生しないとされていたが(Banks *et al.*, 1994)，本研究では特に高いとはいえない精子濃度でもマガキ卵×mtシカメ型カキ精子の組み合わせで最高で5.7%の発生率を得た。また，この交配組の正常D型幼生率や稚貝生産率は他の交配組と比べて特に劣るようなことは無かった。これらについては他の交配組の精子・卵や幼生が混入した可能性や，用いた雌が雌雄同体で採取した卵に精子が混入していて結果として自家受精した可能性が考えられる。しかし，採卵後2時間以上経過した未受精卵の検鏡ではどの雌でも発生している卵は認められないことから自家受精の可能性は無く，媒精操作や飼育管理ではcontaminationに細心の注意を払っているため精子・卵や幼生が混入した可能性も低い。加えて，分析した稚貝のCaM intron 3の型が親のCaM intron 3型から出現が期待される型とすべて一致していることは，この稚貝が交配に用いた雌雄のカキの受精により生じたことを強く示唆している。

Banks *et al.* (1994)はマガキ卵に対するシカメ精子の付着能力が弱いことを示し，シカメ精子とマガキ卵膜間の反応の分子機構が両者の隔離の原因であると推測している。本研究でmtシカメ型カキ♀×マガキ♂の交配ではマガキ♀×マガキ♂場合と同等の発生率や正常D型幼生率が得られ，また，マガキ♀×mtシカメ型カキ♂の交配で低率ながら発生した卵もその後の正常D型幼生率や稚貝生産率は他の交配区と同等であることを考えると，受精後の核ゲノムではマガキとシカメ間の隔離機構は殆ど存在しないと考えられ，この交配では精子・卵膜間の分子機構が唯一の隔離機構であると推察される。

沼知（1971）は，現在ではシカメと考えられている有明海産のA型のマガキの卵について，北海道，宮城，広島の各地産マガキの精子との交配では受精率が90%以上であり，有明海産のB型のマガキの精子との交配では濃厚な精子液（dry spermの10^{-3}～10^{-4}希釈海水中）を用いた場合受精率が70～90%であることを示している。dry spermの精子濃度をほぼ10^{10}個/mLとするとこれは本実験の10倍ほどの精子濃度にあたる。また，Banks *et al.*（1994）はmtシカメ型カキ♀の卵（1,200個/mL）を用いた一対交配で，mtシカメ型カキ♂の精子（500精子／卵）とは91.3%，マガキ精子とは94.5%の受精率を得ているが，卵割以後の発生状況については不明である。

本研究ではCaM intron 3の型がそれぞれ異なるmtシカメ型雌の卵を用い，特に濃厚ではない範囲と考えられる精子濃度で受精させた結果，CaM intron 3各型のmtシカメ型カキ♂およびマガキ♂の精子で受精させた時の発生率と正常D型幼生率はいずれの精子の間でも顕著な差は無く，mtシカメ型カキ♀の卵の初期発生の成否は親の16SrRNA遺伝子型やCaM intron 3の型には左右されないものと思われた。

幼生の生残率については1997年交配群で飼育初期に雌親の違いによる顕著な差がみられ，2000年交配群でも飼育開始18日目には雌親，雄親の違いによる差が生じた。一般にカキ類の幼生は雌親の卵質が悪い場合受精後1週間ほどで大量に斃死し，これらの母性効果が原因となり雌親間で幼生の生残率に差が生じることがあり，1997年交配群はこのような例である可能性も考えられる。しかし，2000年交配群の雌親の場合は飼育開始11日目では親の違いによる有意な影響が見られなかったにもかかわらず着底期前の18日目になって影響が出ているため，母性効果以外の要因が影響していると考えられた。このうちマガキを雌親に用いた交配組のうちマガキ♀×マガキ♂以外では得られた幼生数が特に少なかったため，他の交配区とは異なり500mLビーカーで飼育しており，このことに起因する飼育環境の違いが影響している可能性もある。しかし，シカメ・ハイブリ♀からの幼生や雄の組み合わせに関してはこのようなことは無く，遺伝子構成の差が起因して発生途上の生理的状態が異なったなど，遺伝的な要因が影響しているものと推察される。さらに，マガキとシカメ・ハイブリを用いた組み合わせで幼生の生残に及ぼす雌親の影響と雄親の影響が互いに逆になったことから，性に関する形質との関連も示唆され，今後さらに検討する必要がある。

付着期～着底期後にあたる飼育開始39日目では親の

違いによる明らかな差はみられなかったが，この時点での幼生は斃死の他に着底によっても数が減少するので単純な評価はできない。しかし，稚貝計数時の死殻状況の観察ではマガキを雌親にした区で特に死殻が多いことは認められず，マガキを雌親とした幼生の減少は殆どが着底によるものと考えられることから，マガキの雌親からの幼生に比べ，他の雌親からの養成は全体的に幼生期間が長いものと考えられた。特に，飼育開始39日目時点での幼生の生残率が0.2以上を示す8例のうち，4例はmtシカメ型カキ♀×マガキ♂の交配組，残りの4例のうち3例はCaM intron 3の型が異なるmtシカメ型カキどうしの交配組であり，遺伝子構成の差が影響しているものと思われた。幼生がこのまま着底能力を得られずに斃死した場合は稚貝着底率が少なくなると考えられるが，飼育開始39日目の幼生の生残率と稚貝生産率にこのような対応は見られず，幼生期間が長い交配組でも最終的にはその殆どが着底しているものと推察された。

交配により得られた稚貝を今後引き続いて飼育し成熟状況等を調べるため，本研究では遺伝子解析に供した稚貝数が少なかった。そのためCaM intron 3について各接合型の分離比は解析していない。しかし，シカメ・シカメ2を雌親とした場合を除いた全ての交配組から生じた稚貝の各接合型の出現状況からは，少なくとも特定の接合型が受精卵～稚貝の間で消失するということは無く，CaM intron 3がメンデル遺伝をしていることを否定するものではなかった。

一方，シカメ・シカメ2を雌親とする交配組の稚貝のCaM intron 3では出現が期待されない接合型が現れ，また，出現が期待される型が現れない例もあった。シカメ・シカメ2♀×マガキ♂の交配組では調べた12個体の稚貝の半数の6個体が出現が期待されないマガキ型であった。マガキどうしの交配では異数体が生じることが知られていて，特に成長の遅い幼生では20%近く出現することが知られている（Thiriot-Quiévreux *et al.*, 1988）。本研究の交配で雌由来の染色体セットのうちcalmodulin遺伝子が存在する染色体が発生初期に失われ，その個体が稚貝期まで生き残ったと仮定すると雄由来のCaM intron 3だけでマガキ型を示す可能性があるが，分析個体の半数までもが異数体を示すにはカキの染色体セット（n=10）の中からcalmodulin遺伝子が存在している染色体だけが選択的に高率で失われる必要があり，本実験の結果の理由としては考えにくい。また，魚類では異種交配で卵が雌性発生する例が知られているが（Na-Nakorn *et al.*, 1993），本研究のシカメ・シカメ2♀×マガキ♂での核DNA型の不整合性は雌性発生ではなく雄性発生でなくては説明がつかない。二枚貝類の雄性発生は実験的に誘導することさえ困難であり，これが原因である可能性は低い。さらに他の交配区とのcontaminationの可能性についても，不整合のDNA型が高率で現れていること，他の交配組ではそのような例がないことなどにより可能性は低い。シカメ・シカメ2♀×シカメ・シカメ2♂の交配組ではCaM intron 3について出現が期待される3つの型のうち1つが現れなかった。これは，分析個体数が少なかったため検出からもれた可能性があるとともに，稚貝期までに選択的に集団から取り除かれた可能性も考えられる。いずれにしろ，CaM intron 3のシカメ2型についてはDNA解析方法も含め今後さらに検討する必要がある。

一般的に動物ではmtDNAは母系遺伝をすると言われている。しかし，イガイ類*Mytilus* sp.や（Zouros *et al.*, 1992），最近ではアサリ*Tapes philippinarum*でも（Passamonti and Scali, 2001），精子のmtDNAが卵に侵入して雌親由来のmtDNAとともに次代へ引き継がれる例が知られていて，これは二枚貝類に広くみられる現象ではないかとも推察されている。イガイ類ではこの雄親由来のmtDNAが侵入した受精卵が，おそらく核DNAとmtDNAとの協調により，やがて雄個体となって精子を形成し，雄親由来のmtDNAがさらに次代の雄へと引き継がれてゆくことによりmtDNAの雌系列と雄系列が別々に存在することとなり，Doubly Uniparental Inheritance（DUI）と呼ばれている（Skibinski *et al.*, 1994; Geller, 1994; Saavedra *et al.*, 1996; Saavedra *et al.*, 1997）。また，哺乳類であるマウスでも異種間交雑では父親のmtDNAが次代へ伝達される例が知られている（Gyllensten *et al.*, 1991）。本研究ではマガキ♀×mtシカメ型カキ♂の全ての交配組で，稚貝にシカメ型のmtDNAが検出される個体が少数ながら確認された。本研究で用いたmtDNAの判別法ではマガキ型のmtDNAは検出されないため，この個体にマガキ型のmtDNAも含まれているのか，また，mtシカメ型カキ♀×マガキ♂の交配組からの稚貝にマガキ雄由来のmtDNAを有する個体が存在したかどうかは不明であるが，マガキとシカメのmtDNAが同一個体で存在するとすれば，16SrRNA遺伝子の解析だけではマガキとmtシカメ型カキを確実に判別することは困難であり，より多くの方法を検討する必要がある。また，マガキ卵に侵入したシカメ型のmtDNAがイガイ類と同様に性決定機構に携わっているかどうかは稚貝を飼育して確認する必要があるが，これらの個体が生殖能力を持つとすれば，核レベルだけでなくミトコンドリアレベルでもマガキとシカメのゲノムが交流している可能性がある。また，マガキでは一生の間

に性転換する例が知られているが，生殖細胞が増殖する時に雌親と雄親それぞれから由来するミトコンドリアが増殖する割合により性が決定されている可能性など，今後はmtDNAの型と性との関連やmtDNAと核DNAの相互作用も含めてシカメとマガキの交雑・隔離機構を調べる必要がある。

第3章　遺伝率の推定

3-1　有明産および広島産を用いた枝分かれ交配

生物の形質の発現は遺伝要因と環境要因により影響を受ける。どちらの要因がより強く作用するかは用いる生物の遺伝的背景や成育現場の環境的背景により異なるが，多くの形質ではどちらの要因からも影響を受けている。これらの要因を自由に操作して目的とする形質を得られれば産業上理想的であるが，マガキのように天然海域で養殖する水産生物では水温や餌料量などの環境要因を人為的に操作するには相当な困難を伴う場合が多い。そこで，遺伝要因を人為的に操作して生物に改良を加えることにより目的とする形質を得ようとする「育種」に目を向けることになる。育種には，変異の与え方や形質の遺伝的特性に基づき選抜育種，交雑育種，倍数体育種，突然変異育種などの手法がある。成長や身入り度など経済的に重要な形質の多くは，互いに相加的で各々が小さな影響力を持つ多数の遺伝子により支配されていると考えられていて，量的形質として選抜育種による改良が期待できる。理論的にどの程度の改良が期待できるかは，血縁個体間の比較や交配実験により求めた遺伝率で予測することができ，二枚貝類ではマガキ(Lannan, 1972; Hedgecock *et al.*, 1993)，アメリカガキ，ヨーロッパヒラガキ（Newkirk and Haley, 1983)，チリーガキ*Ostrea chilensis*, (Toro and Newkirk, 1991; Toro, 1995)，ボンベイガキ*Saccostrea cucullata*（Jarayabhand, 1995)，アコヤガイ*Pinctada fucata martensii*（和田,1984; Wada and Komaru, 1994)，ヨーロッパイガイ*Mytilus edulis*（Strömgren and Nielsen, 1989)，ホンビノスガイ*Mercenaria mercenaria*（Hadley *et al.*, 1991）等についていくつかの方法で遺伝率が推定されている（Newkirk, 1980)。これらのうちマガキについては，過去に日本から輸出され北米太平洋岸で選抜・維持されてきた系統を用いていて，現在の日本国内に生息するマガキの遺伝率に関する情報は少ない。

遺伝率（ここでは狭義の遺伝率）は，表現型にみられる変異のうちどれだけが親から子へと遺伝する変異であるかを示すが，同じ形質でも生物種により異なるばかりでなく，地方集団間でも異なる可能性があるため，実際に選抜に用いる集団ごとに求める必要がある（佐々木, 1994)。また，同一の集団でも飼育環境その他の環境要因により結果が異なるため，遺伝率は通常，実際の飼育環境下で求める必要がある。しかし，異なる飼育環境からの遺伝率を比較することにより，飼育環境の違いが遺伝率に与える影響や遺伝的要因と環境的要因の相互作用を検討することは，実際の育種作業に有用な情報を与えると考えられる。いくつかある遺伝率推定方法のうち，枝分かれ交配による半兄弟分析法は共分散成分の中に優性分散や環境分散成分を含まず，また，雄親，雌親別に分散成分を求めるため母性効果による偏りの推測にも役立つなど，選抜効果の予測に優れている。

一般的にマガキなど二枚貝類の種苗生産では浮遊幼生は付着後の稚貝に比較して飼育管理が難しい。また，特に付着期は飼育水の環境が悪化しやすいうえ水槽内に浮遊幼生，匍匐幼生および付着稚貝が混在するため，換水等の操作も煩雑となるが，成長の速い幼生の選抜が有効であれば，幼生期の飼育期間や付着開始から終了までの期間の短縮が期待できる。また，アメリカガキでは早期に変態した幼生ほど稚貝期に速い成長を示す結果が得られていて（Losee, 1979; Newkirk *et al.*, 1977)，マガキについても幼生期の成長と成貝期の成長に相関があれば，成貝まで飼育することなく選抜が可能となることが期待できる。

本章では，日本国内のマガキ地方集団を用い，枝分かれ交配による半兄弟分析法により幼生期や稚貝期以降の殻長，重量，生残率等の遺伝率を求めるとともに，異なる養成方法による遺伝率を求め，養成方法の違いが遺伝率推定に与える影響を検討した。

方　　法

親貝として有明産マガキおよび広島産マガキを用いて各々異なる年に交配した。有明産マガキは1993年2月に長崎県北高来郡北高来町湯江にある干潟で採取，広島産マガキは1994年1月に養殖種苗を入手した。各々南西海区水産研究所地先でカゴ飼育後，有明産マガキは1994年9月，広島産マガキは1995年6月に切開法で媒精し，枝別れ交配を行った。用いた親の数，殻高，全重量および軟体部湿重量の範囲をTable 16に，幼生飼育方法をTable 17に示す。

着底期にはカキ殻砕片を飼育容器の底に敷いて幼生を付着させることによりシングルスパットを得た。日本のマガキ養殖ではコレクターによる採苗と養成が主流を占め，本来これにより飼育するべきであるが，コレクターによる養成は付着密度の調節や付着生物の除去，成長に応じた各種管理が困難であり，必ずしも育

Table 16. Parents used for estimation of heritablities by nested design

Locality (male×female)	Sex	n	Shell height (mm)	Whole weight (g)	Fresh wet weight (g)
Ariake	male	3	99～142	56～ 90	9.7～21
(3×5)	female	15	74～130	48～106	6.4～16
Hiroshima	male	3	74～ 99	69～ 92	36～46
(3×5)	female	15	69～108	42～103	22～53

Table 17. Larval culture method

	Ariake	Hiroshima
Date of insemination	1994.9.29	1995.6.28
Method of insemination	artificial insemination by dessection	
Culture container	4L glass bottle (water volume=3L)	
D-shaped larval ratio	81～100%	83～100%
Density of larvae at start	1 larva/mL	3 larvae/mL
Water temperature	23～24℃	26～27℃
Feeds	*Pavlova sp. and Chaetoceros sp.*	
Interval of water replacement	2～3 days, full replacement	47 days, 1/2～2/3 of volume
Spat collection	Fragments of oyster shell were spread on the bottom on 21th day after insemination	Fragments of oyster shell were spread on the bottom on 16th day after insemination

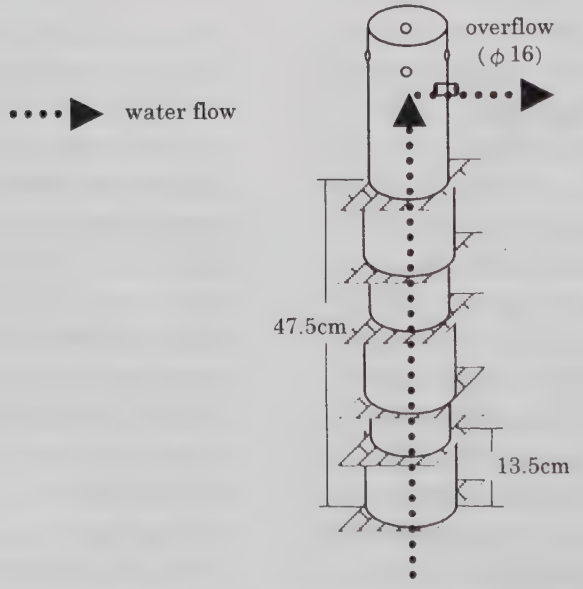


Fig. 55. Structure of upwelling culture tube

種的な目的に適しているとは言えない。そこでここではカゴ養成法とアップウェリング養成法により飼育した。すなわち，採苗後12月までは1 μmカートリッジフィルターで濾過した海水を入れた室内水槽で *Pavlova* sp., *Chaetoceros* sp., *Tetraselmis* sp.を与えて飼育し，12月からは未濾過海水によるアップウェリング飼育に切り替えた。さらに1996年5月にはザブトンカゴに入れて南西海区水産研究所地先の海域で垂下養成し，同年8月からはカゴ養成とアップウェリング養成の2通りに分けて比較養成を行った。カゴ養成には目合い15mmおよび5 mmのザブトンカゴ(35cm四方)を用いた。アップウェリング用の容器として内径130mmの塩ビパイプを網で6段に区切った筒（Fig. 55）を作成し，各段にカキを収容して容量1トンのFRP水槽に並べ未濾過海水を流入させて養成した。養成用筒内は下流（上段）ほど大きな目合いの網を用いて大型の個体ほど下流に配置し，成長に応じても目合いを変えた。1本の筒当たりの流水量は1.5 L/minとした。両養成法とも比較養成開始時の1実験区当たりの収容密度はカゴまたは筒あたり20個体とし，各々の全兄弟について2つの繰り返し実験区を設けた。尚，有明産マガキについては充分な量の稚貝が得られなかったためカゴ養成だけを行った。

広島産と有明産の幼生の殻長と生残率について，広島産ではさらに成貝（受精翌年の産卵期である8月および出荷初期である10月）の全重量と生残率について，Becker（1984）及び Bogyo and Becker（1965）に基づいて半兄弟分散分析による遺伝率を推定した。悉無律形質である生残率については割合の平方根を逆正弦変換後度数に変換した値を用い，級内員数が異なる半兄弟の場合の分散分析により推定した。ただし，成貝期の遺伝率は全重量については養成法別，繰り返し実験区別に算出し，生残率についてはこれらを込みにして算出した。

結　　果

1）有明産マガキ

各実験区のD型幼生，受精20日後幼生の殻長の平均値はそれぞれ68.5～78.3 μm，104～207 μmの範囲であった（Fig. 56，Fig. 57）。また，各実験区の受精20日後の幼生および2ヵ月目の稚貝の生残率はそれぞれ2～58%，0～17%の範囲であった（Fig. 58）。殻長について，D型幼生，受精20日後の幼生の父親成分から求めた遺伝率（h^2_S）は各々0.05, 0.44であった（Table 18, Table 19）。一方，母親成分から求めた遺伝率（h^2_D）はいずれも1より大きな値となった。生残率については受精20日後幼生では父親成分から求めた遺伝率が0.14，母親成分からもとめた遺伝率が0.07であった(Table 20)。

有明産については着底後に充分な個体数が得られなかったのでこれ以後の形質について遺伝率は算出できなかったが，受精後1年以上経過した翌年10月の全重量は全体として交配組間での差は大きくない一方，斃死率は交配組間で大きな差があった。(Fig. 59)

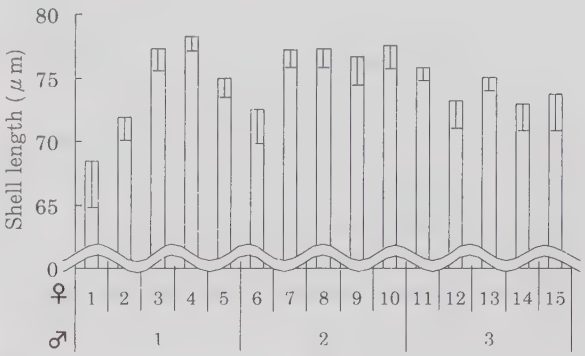


Fig. 56. Shell length of D-shaped larvae (Ariake) Vertical lines in bars denote standard error. 10～109 larvae were measured per one female (mean number = 45)

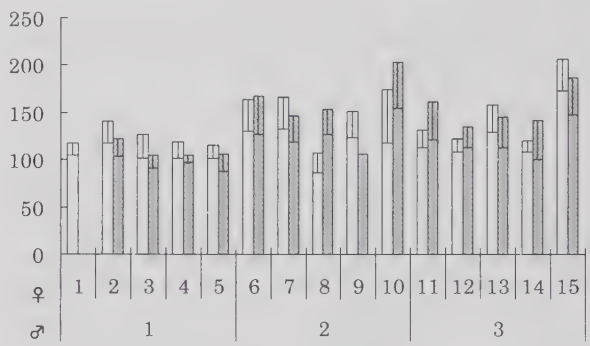


Fig. 57. Shell length of larvae 20 days after insemination (Ariake). A couple of bars for one female express a replication. Vertical lines in bars denote standard error.

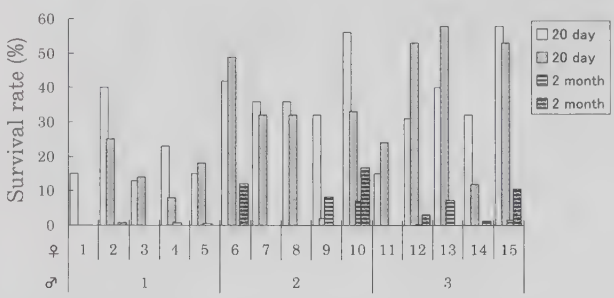


Fig. 58. Survival rates of larvae at 20 days and spats at 2 months after insemination (Ariake). Several bars in each period for one female express a replication.

Table 18. ANCOVA for estimating heritability of shell length of D-shaped larvae (Ariake)

Source	d.f.	SS	MS	EMS
Between sires	2	668.90	334.45	$\sigma^2_W+64.3\sigma^2_D+215.57\sigma^2_S$
Between dams within sires	12	2350.18	195.85	$\sigma^2_W+39.59\sigma^2_D$
Between progeny within dams	667	2196.24	3.29	σ^2_W

$\sigma^2_S=0.10$, $\sigma^2_D=4.82$, $\sigma^2_W=3.29$, $h^2_S=0.048$, $h^2_D=2.348$

Table 19. ANCOVA for estimating heritability of shell length of larvae 20 days after insemination (Ariake)

Source	d.f.	SS	MS	EMS
Between sires	2	176726	88363	$\sigma^2_W+57.68\sigma^2_D+253.71\sigma^2_S$
Between dams within sires	12	366345	30528	$\sigma^2_W+51.06\sigma^2_D$
Between progeny within dams	777	891285	1147	σ^2_W

$\sigma^2_S=212.94$, $\sigma^2_D=575.42$, $\sigma^2_W=1147.09$, $h^2_S=0.440$, $h^2_D=1.189$

Table 20. ANCOVA for estimating heritability of survival rate of larvae 20 days after insemination (Ariake)

Source	d.f.	SS	MS	EMS
Between sires	2	763.65	381.83	$\sigma^2_{b3}+\sigma^2_W+1.96\sigma^2_D+9.66\sigma^2_S$
Between dams within sires	12	1609.59	134.13	$\sigma^2_{b2}+\sigma^2_W+1.93\sigma^2_D$
Between progeny within dams	14	833.31	59.52	$\sigma^2_{b1}+\sigma^2_W$

$\sigma^2_S=30.46$, $\sigma^2_D=14.13$, $\sigma^2_W=821$, $\sigma^2_{b3}=47.38$, $\sigma^2_{b2}=47.41$, $\sigma^2_{b1}=46.86$, $h^2_S=0.141$, $h^2_D=0.065$

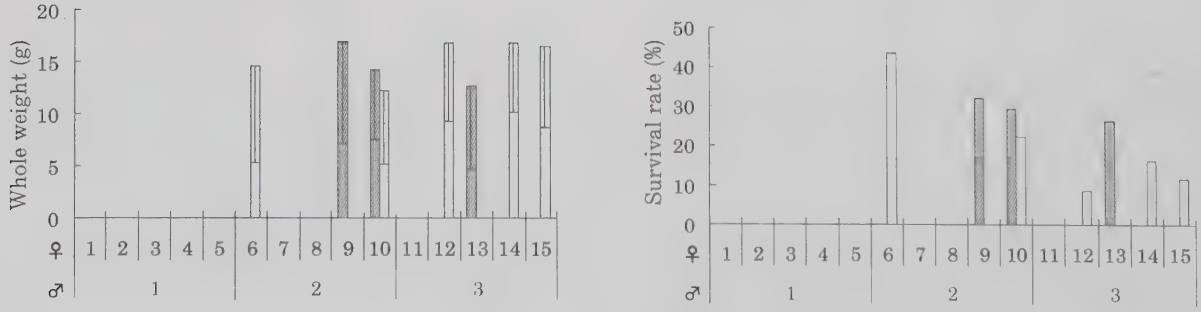


Fig. 59. Whole weight and survival rate of oysters (Ariake). whole weight ; 13 months after insemination survival rate ; between 3～13 months after insemination. Several bars for one female express a replication. Vertical lines in bars denote standard errors

2）広島産マガキ

各実験区でのD型幼生（媒精2日後），受精15日後の幼生および受精6ヵ月後の大型個体（目合い5mmの網で選別）の殻長の平均値はそれぞれ86.1～91.8μm，110～270μm，5.9～10.5mmであった（Fig. 60，Fig. 61，Fig. 62）。これらの殻長について父親成分から求めた遺伝率は各々0.33，－0.15および0.09，母親成分から求めた遺伝率は0.39，0.83および0.86であった（Table 21，Table 22，Table 24）。また，受精15日後までの幼生の生残率の父親成分，母親成分から遺伝率は各々0.93，0.74であった（Table 23）。受精翌年8月と10月の全重量の平均値および5～10月の生残率はそれぞれ15～27g，19～45gおよび32～100%の範囲だった（Fig. 63，Fig. 64，Fig. 65）。

父親成分からの遺伝率は8月の全重量で0以下，10月の全重量で0.06～0.43の範囲であり，5～10月の生残率で0.77であった（Table 25）。受精翌年の10月の全重量を目的変数としたときの日間増重率，生残率，15日幼生の殻長，同生残率との相関係数は－0.42～0.41の範囲であった（Table 26）。着底前幼生の殻長と成貝の全重量との相関係数はアップウェリング養成で－0.28，カゴ養成で－0.30であった（Fig. 66）。

3）アップウェリング養成法とカゴ養成法の比較

広島産マガキについて比較養成開始時から出荷初期である10月までの全重量の平均日間増加率はアップウェリング養成ではカゴ養成に較べ低い値を示した（Fig. 67）。受精後14～16ヵ月の生残率はアップウェリング養成で55～100%（平均95.6%），カゴ養成で40～100%（平均89.0%）であり，全体としてはアップウェリング養成の方がやや高い生残率を示した（Fig. 68）。

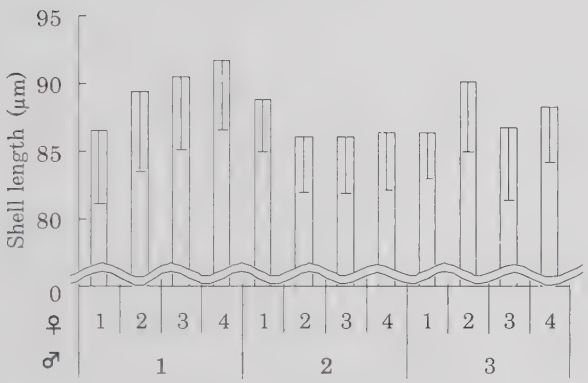


Fig. 60. Shell length of D-shaped larvae (Hiroshima). Vertical lines in bars denote standard errors 23～399 larvae (121 in average) per female were measured

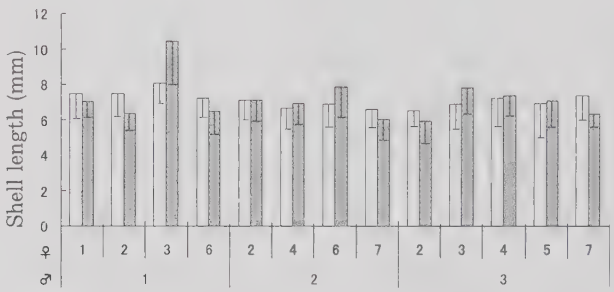


Fig. 62. Shell length of juvenile oysters 6 months after insemination (Hiroshima). Oyters less than 5mm were not used Vertical lines in bars denote standard errors. Several bars for one female express a replication.

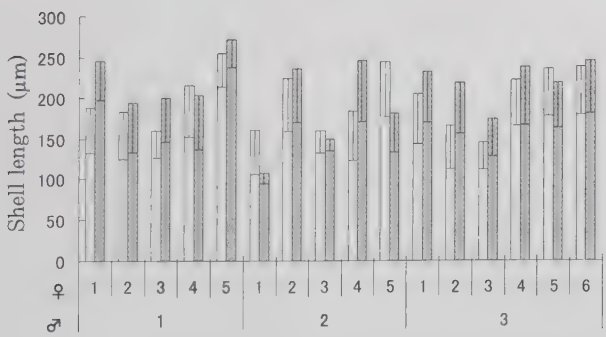


Fig. 61. Shell length of larvae 15 days after insemination (Hiroshima). Vertical lines in bars denote standard errors. Several bars for one female express a replication.

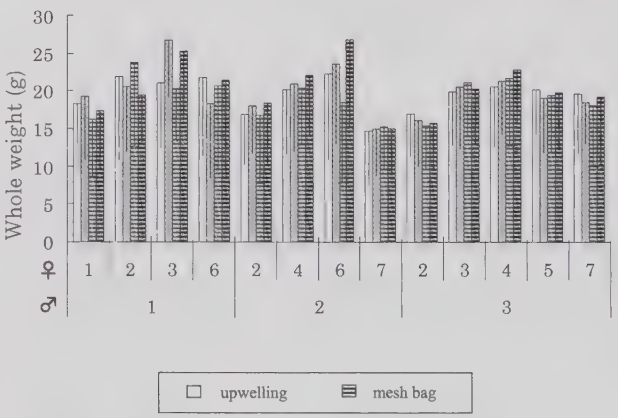


Fig. 63. Whole weight of one-year-old oysters in August (Hiroshima). Vertical lines in bars denote standard errors. Several bars for one method express a replication.

Table 21. ANCOVA for estimating heritability of shell length of D-shaped larvae (Hiroshima)

Source	d.f.	SS	MS	EMS
Between sires	2	2399.7	1199.86	$\sigma^2_W+136.8\sigma^2_D+421.4\sigma^2_S$
Between dams within sires	9	2529.0	281.00	$\sigma^2_W+109.2\sigma^2_D$
Between progeny within dams	1445	29172.1	20.19	σ^2_W

$\sigma^2_S=2.02$, $\sigma^2_D=2.39$, $\sigma^2_W=20.19$, $h^2_S=0.329$, $h^2_D=0.389$

Table 22. ANCOVA for estimating heritability of shell length of larvae 15 days after insemination (Hiroshima)

Source	d.f.	SS	MS	EMS
Between sires	2	59193	29596	$\sigma^2_W+204\sigma^2_D+961\sigma^2_S$
Between dams within sires	13	2164398	166492	$\sigma^2_W+180\sigma^2_D$
Between progeny within dams	2948	10737127	3642	σ^2_W

$\sigma^2_S=-164.99$, $\sigma^2_D=903.45$, $\sigma^2_W=3642.17$, $h^2_S=-0.151$, $h^2_D=0.825$

Table 23. ANCOVA for estimating heritability of survival rate of larvae 15 days after insemination (Hiroshima)

Source	d.f.	SS	MS	EMS
Between sires	2	1149.7	574.86	$\sigma^2_{b3}+\sigma^2_W+2.00\sigma^2_D+10.6\sigma^2_S$
Between dams within sires	13	2487.8	191.37	$\sigma^2_{b2}+\sigma^2_W+2.00\sigma^2_D$
Between progeny within dams	14	833.31	59.52	$\sigma^2_{b1}+\sigma^2_W$

$\sigma^2_S=37.74$, $\sigma^2_D=29.84$, $\sigma^2_W=94.07$, $\sigma^2_{b3}=20.08$, $\sigma^2_{b2}=18.72$, $\sigma^2_{b1}=18.90$, $h^2_S=0.934$, $h^2_D=0.738$

Table 24. ANCOVA for estimating heritability of shell length of juvenile 6 months after insemination (Hiroshima). Oysters less than 5 mm were not used.

Source	d.f.	SS	MS	EMS
Between sires	2	140.98	70.49	$\sigma^2_W+78.4\sigma^2_D+246.3\sigma^2_S$
Between dams within sires	9	357.36	39.71	$\sigma^2_W+56.3\sigma^2_D$
Between progeny within dams	730	1720.86	2.36	σ^2_W

$\sigma^2_S=0.07$, $\sigma^2_D=0.66$, $\sigma^2_W=2.36$, $h^2_S=0.085$, $h^2_D=0.860$

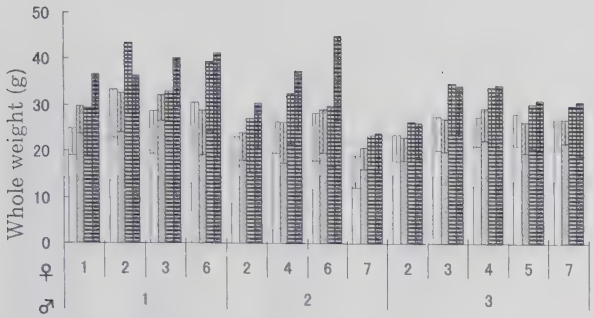


Fig. 64. Whole weight of one-year-old oysters in October (Hiroshima). Vertical lines in bars denote standard errors. Several bars for one method express a replication. □ ; upwelling, ▤ ; mesh bag.

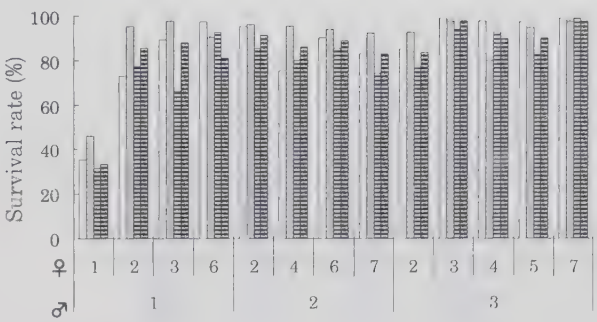


Fig. 65. Survival rate of one-year-old oysters between May and October (Hiroshima). Several bars for one method express a replication.
□ ; upwelling, ▤ ; mesh bag.

Table 25. Heritabilities of whole weight and survival rate estimated for adult oysters (Hiroshima)

	Culture method	Replicate	h^2_S	h^2_D	h^2_{S+D}
Whole weight in August (one-year-old)	upwelling	1	0.00	0.05	0.03
		2	-0.06	0.38	0.16
	mesh bag	1	-0.01	0.06	0.08
		2	-0.13	0.49	0.18
Whole weight in October (one-year-old)	upwelling	1	0.20	0.34	0.27
		2	0.43	0.23	0.33
	mesh bag	1	0.29	0.32	0.31
		2	0.06	0.75	0.40
Survial rate between May and October (one-year-old)	upwelling and mesh bag			0.77	0.93	0.85

Table 26. Correlation coefficients with whole weight in October

Character	Upwelling	Mesh bag
Diurnal growth rate	0.243	0.406
Survival rate between May and October	-0.204	-0.159
Shell length of 15 d larvae	-0.275	-0.304
Survival rate of 15 d larvae	-0.212	-0.415*

* ; significant at the 5% level

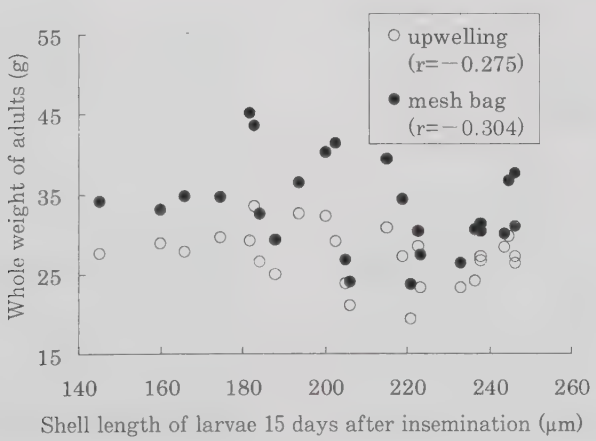


Fig. 66. Relationship between larval shell length and whole weight in adults

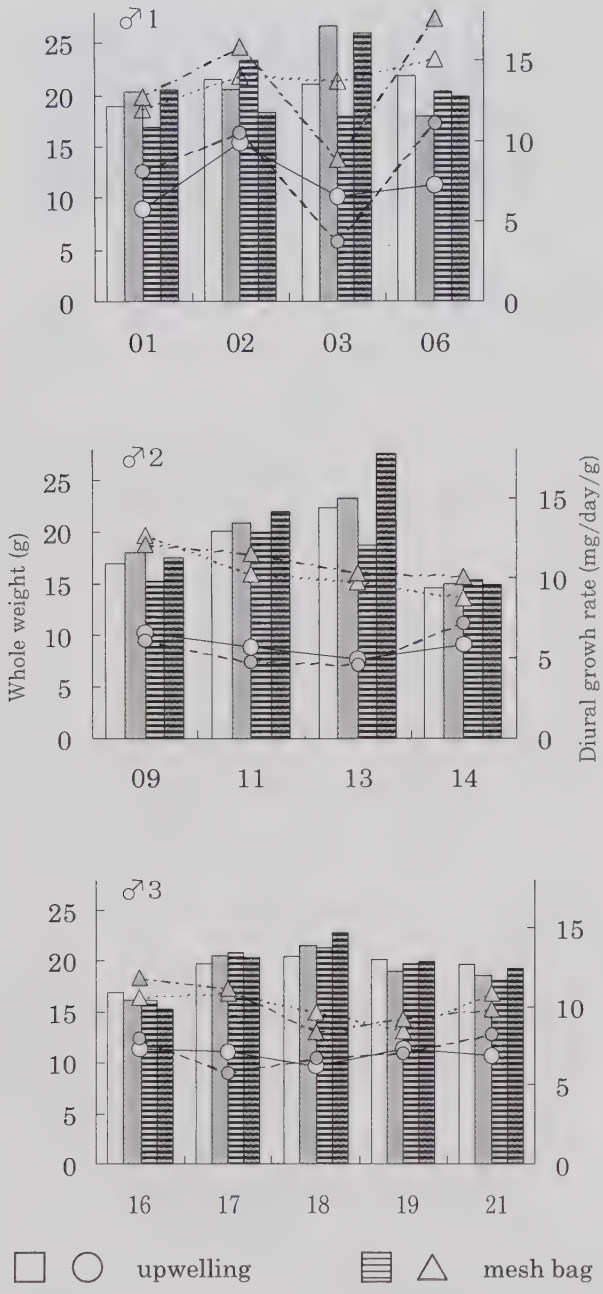


Fig. 67. Whole weight at 14 months and diural growth rate from 14 to 16 months

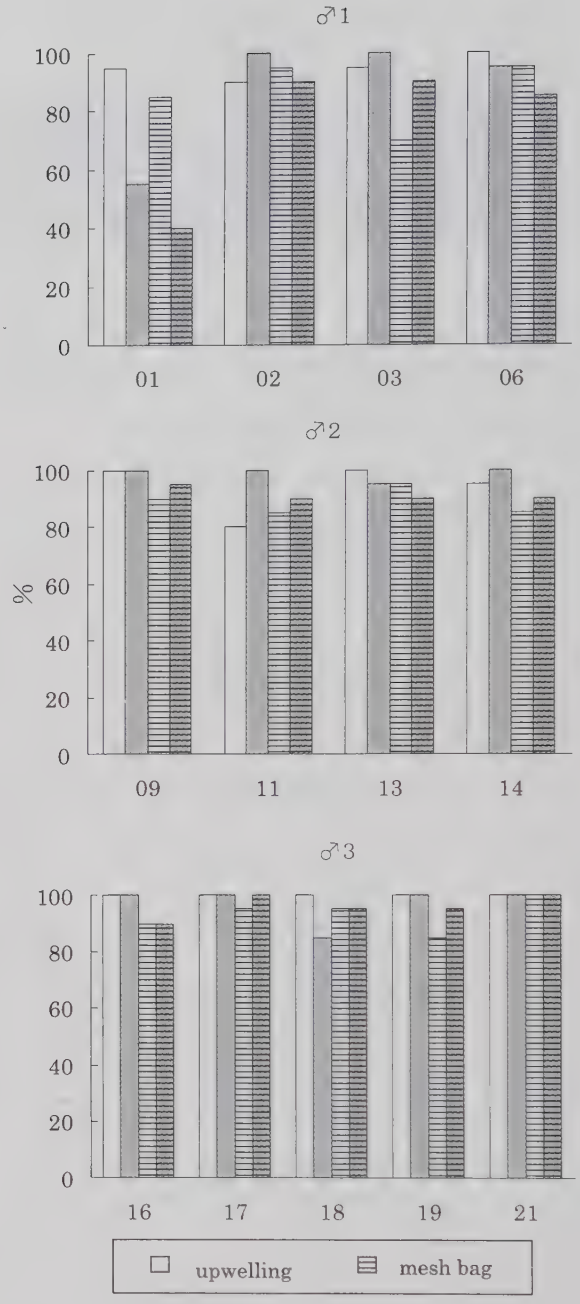


Fig. 68. Survival rates between 14 and 16 month after insemination. Oysters were divided to two (upwelling and mesh bag) methods at 14 months after insemination.

考　　察

ある形質が遺伝的であると言うとき，その形質が遺伝子型によって決定されていると言う意味にも，その形質が親から子へ伝達されると言う意味にも解釈できるが，これら2つの意味は同じではない（Falconer, 1989）。前者に関し，遺伝子型分散（V_G）と表現型分散（V_P）の比 V_G/V_P は個体の表現型値のうち遺伝子型値によって決定される程度を示し，「広義の遺伝率」と呼ばれる。V_GとV_Pは，普通，観察値から直接には推定できず，たとえば近交系やクローン（$V_G \fallingdotseq 0$）を用いてV_Pを推定し，これを全ての遺伝子型が混じっているもとの集団の表現型分散から引いてその集団のV_Gを推定する。ただし，特定の遺伝子型を構成する遺伝子のペアは減数分裂の際別々に分かれて異なる配偶子に入り，次代では新しい遺伝子型を構成することになるので，遺伝子型は当該世代限りのものであり，このよ

うな非相加的遺伝子効果に基づく差は遺伝しない。一方，遺伝子型分散（V_G）は相加的遺伝分散（V_G），優性分散（V_D）およびこれらの相互作用（V_I）に分割でき，相加的遺伝分散（V_A）と表現型分散（V_P）の比V_A/V_Pは個体の表現型が親から受け継いだ遺伝子の効果によって決定される割合を示し，「狭義の遺伝率」と呼ばれる。単に「遺伝率」という場合は「狭義の遺伝率」を意味し，育種計画には非常に重要な値である（Falconer, 1989）。

本研究では枝分かれ交配により狭義の遺伝率を求めたが，D型幼生，受精15日または20日後幼生および稚貝期の殻長で，有明産・広島産とも父親成分からの遺伝率にくらべ母親成分からの遺伝率がかなり大きな値を示す傾向にあった。母親成分からの遺伝率では相加的遺伝分散の他に共通環境分散や優性遺伝分散が加わっているものとされ，このことから，これらの形質には例えば雌親の卵質の差や遺伝子の優性効果などが大きく影響していると推察された。本研究では媒精にあたり外見的に軟体部の発達が悪い個体は親として用いなかったものの，D型幼生率には全体で81～100%の幅があった。マガキの「卵質」に関する明確な定義は無いが，幼生の発育に必要な卵の質に雌親間で何らかの差があった可能性が考えられる。これら雌親内の共通環境要因を最小限に抑えて選抜の効果をあげるためには，親貝の適正な養成方法を検討して個体ごとの成熟の程度をできるだけ揃えるとともに，個体ごとにタイミングを揃えて産卵誘発できる方法の開発が必要である。

二枚貝類の幼生の殻長の遺伝率について，Newkirk（1977）はアメリカガキの総当り交配により6日および16日幼生で0.25～0.50と推定した。また，Strömgren and Nielsen（1989）はヨーロッパイガイの枝分かれ交配により14日および28日幼生の殻長の雄親成分からの遺伝率をそれぞれ0.8および0.5と推定し，いずれも選抜効果が期待できることを示している。

本研究で，雌親成分からの値が1以上の場合は雄親成分からの値（h^2_S）を，それ以外の場合は雄親成分からと雌親成分からの値の平均値（$(h^2_S+ h^2_D)/2$）を遺伝率とすると，有明産および広島産の幼生はD型幼生の殻長で0.05および0.36，着底前幼生の殻長で0.44および0.34となり，着底前幼生の殻長についてはどちらの産地のカキでもアメリカガキと同程度の遺伝率であった。しかし，幼生期の殻長と成貝期の全重量の間には明確な相関や大きな値どうしの対応が認められず（Table 26, Fig. 66），幼生段階での選抜により速い成長を示す成貝を得ることは期待できないと考えられた。

一般的に遺伝率が低い形質は近交退化が発現しやすく，個体選抜よりは家系選抜が有効である。本研究では10月の全重量について父親成分からの遺伝率の平均値はアップウェリング養成で0.31，カゴ養成で0.17であり，選抜育種を行う際には家系選抜が適している形質であると言える。マガキ成貝の重量の遺伝率について，Lannan（1972）はマガキの全兄弟分析により0.33，Hedgecock *et al.*（1993）は総当りおよび枝分かれ交配での分析により0.2程度と推定していて，本研究での値と近いものになっている。かつて日本から輸出され米国西岸で保持されてきたマガキは広島産のマガキとは相当異なる環境中で世代を経たものと思われるにも関わらずこれらが同程度の遺伝率を示したことは，成貝期の全重量に関する遺伝分散成分は広範な環境下で安定した割合を示す可能性を示唆する。

広島産での成貝期について，生残率は全重量よりも高い遺伝率となった。遺伝率は求められなかったものの有明産の枝別れ交配でも交配組により生残率は大きく異なっていて，生残率は全重量よりも大きな選抜の効果が期待できると考えられた。

一般的に，生残率など適応度と密接な関係にある形質は遺伝率が低い傾向があると言われている（Falconer, 1993）が，Beattie *et al.*（1980）は斃死期間を生き残ったマガキ系統群が対照よりも高い生残を示すとし，本研究の結果と同様，選抜に有効な遺伝的変異の存在を裏付けている。

なお，広島産の♂1×♀1からの全兄弟群は養成方法や繰り返し実験区にかかわらず，一貫して他の交配組の2分の1程度の生残率を示した（Fig. 68）。この兄弟群は幼生期や稚貝期の生残率が他の群よりも特に低くは無かったことから，いわゆる卵質の影響が尾を引いたためとは考えられず，何らかの遺伝的な要因によるものと推察された。この要因が雌だけに起因するものか雌と雄の組み合わせにより生じるものかは総当り交配等による分析を実施しないと解らないが，交配群内でのこのような特異的な兄弟群の存在は，相加的遺伝分散の比率を前提とした遺伝率の推定に大きな歪みを与えるものと考えられる。

広島産について，成貝期の全重量の遺伝率では，アップウェリング養成，カゴ養成とも，8月よりも10月で遺伝率が高い傾向があった。

実験区内での8月と10月の全重量の変動係数の対応をFig. 69に示すが，変動係数の共分散分析ではアップウェリング養成とカゴ養成の回帰係数の間には有意差がなく（$F=0.576$, $df=1, 73$），また，1より小さい傾きを示すことから，両養成法とも2ヵ月間で各雌親内全兄弟個体間のバラツキが減少したことが解る。カゴ養成では比較養成前の飼育密度は比較養成時のほぼ2倍であったが8月以降は実験区あたりの収容密度が小さく

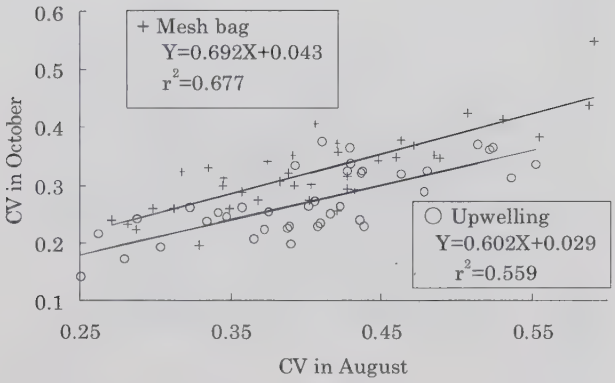


Fig. 69. Relationship between coefficients of variations for whole weight in August and October

なったため餌やスペースの競合などの影響が各雌親内全兄弟個体間で変化したことが10月の遺伝率を8月より高めた一つの要因である可能性がある。

また，Fig. 69で両養成法のY切片には危険率1％で有意差があり（F=30.86, df=1, 74），アップウェリング養成はカゴ養成に較べ実験区内のバラツキがより小さくなる傾向があった。これは主に，アップウェリング養成ではこの期間の流水量（1.5L／分／筒）が充分でなく，また，大型の個体ほど下流に配置したため，特に大型の個体で餌料が不足気味となり実験区内の個体の大小差が減少したためと推定された。

一方，8月の全重量について各繰り返し実験の平均値の差のt検定ではアップウェリング養成，カゴ養成とも5％水準で有意差がある組が1組ずつであったが，10月にはアップウェリング養成で5％水準で有意差がある組が1組，カゴ養成では1％および5％がそれぞれ1組であり，全重量についてアップウェリング養成は繰り返し実験区の間の差を小さくする効果があるものと思われた。

これらのことより，未濾過海水によるアップウェリング養成ではカゴ養成に較べ実験区の間での環境の差を小さくすることが可能と思われるが，十分な流水量の確保が必須であることが確認された。

生残率は全体的にはアップウェリング養成の方がやや高い値を示したが，同一交配組の繰り返し実験区間の差の絶対値を合計すると，アップウェリング養成で105%，カゴ養成で115%となり，全重量での結果同様，生残率でもアップウェリング養成の方が実験区の間の差を小さくする効果があった。しかしアップウェリング養成では，斃死個体の腐敗物が同じ実験区内の他個体に影響して連鎖的に斃死を引き起こしやすいことも観察され，流水量が少ない場合はこのことにより実験区間の差が大きくなる可能性もあることが推察された。

第4章　精子と幼生の凍結保存

配偶子の凍結保存は系統保存，飼育管理の省力化および各種生物検定など様々な分野での応用が期待でき，家畜類の精子ではすでに実用化されている。水産動物の配偶子についても凍結保存技術の実験的な研究はなされているが，育種的気運が希薄であったことから実用化には至っていない。しかし近年，生物多様性の保全への関心が高まるなか，水圏生態系構成種の遺伝資源保存技術の一つとしても配偶子の凍結保存に関して実用化への進展が求められている（Thorpe *et al.*, 1995）。

本研究では，マガキ遺伝資源の保存方法の一つとして，その精子と幼生の凍結保存について検討する。

4-1　精子の凍結保存

一般的に精子は卵に較べ取り扱いや実験設定が容易であり，水産無脊椎動物ではウニ，アワビやカキなどの精液の凍結保存に関する報告がある。マガキについては性転換する性質を利用して凍結精液による自家受精も試みられている（Lannan, 1971）。

マガキ精液の凍結保存に関するこれまでの研究により，凍害保護剤としてはジメチルスルホキシド(DMSO)が有効であること（Bougrier and Rabenomanana, 1986; 岩田ら, 1989; Yankson and Moyse, 1991），凍結精液の受精能力が新鮮精液より劣ること（岩田ら, 1989）などが明らかにされている。冷却方法としてはメタノール・ドライアイスを用いた方法（岩田ら, 1989）や液体窒素蒸気を用いた方法（Lannan, 1971; Bougrier and Rabenomanana, 1986）などが採用されているが，液体窒素蒸気中での比較的急速な冷却では適切な冷却条件が十分に検討されたことがなく，具体的な冷却条件が冷却速度と凍結精子の性状に与える影響の検討が残されている。また，母貝を変えた交配実験や生物検定など，同じ個体から採取した精液を多回にわたり使用する必要がある場合，採取した精液を多くのロットに分けて保存することが要求されるため，原精液の希釈が解凍後の精子に及ぼす影響や媒精に必要な精子数の評価が必要となる。さらに，これまでの研究例での保存期間は数日～数ヵ月であるが，実用的には数年間に亘る保存が要求されるため，長期保存が精子に及ぼす影響を評価する必要もある。

本研究ではマガキの精液の凍結保存について過去の研究例を基礎として，補助的な凍害保護剤の添加効果，液体窒素蒸気による方法を中心とした冷却条件，冷却時の精子濃度が媒精後の発生に及ぼす影響および受精に必要な卵あたりの精子数を検討するとともに，これらの結果に基づいて冷却後長期間保存した精液で媒精

した卵の発生経過から，凍結精液の実用化の可能性を探ることを目的とした。

4-1-1　凍害保護剤と冷却方法の検討

方　　法

実験は1991年8月から1995年9月にかけて行った。材料には南西海区水産研究所地先の筏に垂下してカゴ養殖した1～3齢の広島産または宮城産マガキを用いた。これらのカキの殻表面に付着した生物や泥などを取り除いて殻を開け，ガラスピペットで軟体部上皮を貫通して採精・採卵を行った。

凍害保護剤の溶媒は岩田ら（1989）に基づき2/3濃度人工海水とした。原精液を2/3濃度人工海水により一定の濃度に希釈し，これとは別に凍害保護剤を添加した希釈液を作成後，これらを1:4の比率で混合して保存用の精液とし，容量500μLの牛精子用ストロー精液管（外径3mm，長さ125mm，塩化ビニール製，富士平工業㈱）に200μLを充填後，一端を熱融解して封入した。保存用精液の精子濃度は108精子/200μLを基本とした。封入後すぐに冷却を開始し，冷却終了後のストロー管は液体窒素中で少なくとも1時間以上保存した。温度変化は密封していないストロー管中の精液に熱電対センサーを直接差し込んで記録した。

解凍は撹はんした室温水道水中（21～24℃）にストロー管を1分以上浸漬することにより行った。精子の生残は0.3%トリパンブルー溶液を用いたdye exclusion法により判定し，顕微鏡下での運動性は＋＋（殆どの精子が活発に運動），＋（ほぼ半数以上の精子が運動），±（ほぼ半数以下の精子が運動），－（ほぼすべての精子が静止）の4段階で評価した。

媒精は27℃に設定したウオーターバスにセットしたフラスコ（容量100mL）内の100mL海水中へ105個の卵を入れた直後にストロー管1本分の精液を添加しフラスコを手で軽く振って撹はんすることにより行い，精液添加後の洗卵は行わなかった。媒精には顕微鏡下で外見的に十分な熟度と思われる卵を使用した。媒精2～3時間後にフラスコ底から採取した卵の分割卵の割合を求めて受精率とし，また，媒精6～7時間後，撹はん棒でフラスコ内を軽く撹はんした直後に採取した一定量の海水中の浮遊幼生（胞胚期～嚢胚期）と未発生の卵を計数し，全数に対する幼生数の割合を浮遊幼生率とした。

幼生の飼育は孔径0.2μmのカートリッジフィルターで濾過した海水を入れたガラス製の3L容ビーカー中で行い，餌料としてはハプト藻類の*Pavlova* sp.を用いた。

以上の方法は，精子の凍結保存に関するこれ以降の実験に共通して用いた。

ここでは，凍害保護剤の種類と冷却方法を組み合わせて精液を凍結し，液体窒素中に20時間保存後解凍して精子の生残率を算出した。また，新鮮精液を用いた場合と凍結精液を用いた場合の浮遊幼生率の比を相対浮遊幼生率として算出した。冷却時には各組み合わせとも4本のストロー管を供試した。

①凍害保護剤

8%DMSOを主たる凍害保護剤とするなかで，脱水の促進と細胞膜の保護および水分子の安定の観点から，補助的な保護剤としてシュークロースと還元型グルタチオンおよび牛胎児血清を添加した下記の希釈液について，解凍後の精子の生残率と浮遊幼生率を比較した。凍害保護剤の濃度はいずれも精液と混合後の最終濃度（%は体積比）を示す。

希釈液A：8% DMSO

希釈液B：8% DMSO，50mM ｼｭｰｸﾛｰｽ，6mM 還元型ｸﾞﾙﾀﾁｵﾝ

希釈液C：8% DMSO，36mM ｼｭｰｸﾛｰｽ，4.3mM 還元型ｸﾞﾙﾀﾁｵﾝ，20% 牛胎児血清

なお，冷却方法の検討には希釈液Bを用いた。

②冷却方法

プログラムフリーザー等の特殊な機器を使用せず，ストロー管を冷却する方法として，

方法1：液体窒素保存容器中の液面から5cm上方に金属製キャニスターの底面を固定し，その中にストロー管を垂直に収容して10分間静置

方法2：岩田ら（1989）の冷却方法に基づき，ガラス製試験管にストロー管を収容してメタノール・ドライアイス中に60分間浸漬

方法3：ストロー管のまま超低温庫内（－80℃）に60分間静置

の3法を比較した。

結　　果

解凍後精子の生残率はどの冷却方法でも希釈液Cを用いた場合が70%以上でもっとも高い値を示した（Table 27）。一方，相対浮遊幼生率はどの希釈液でも方法1でもっとも大きかった。方法1の希釈液間で浮遊幼生率を比較すると希釈液Bが45.9%でもっとも高く，精子生残率が高かったCは12.4%ともっとも低い値を示した。また，希釈液Bでは解凍後に精液が凝集する程度がAより軽微で，媒精時の取り扱いが容易であった。なお，－60℃までの平均冷却速度は，方法1では－114.3°C／分，方法2では－9.4°C／分，方法3では－6.1°C／分であった。

Table 27. Effect of diluent type and cooling method on the viability and motility of cryopreseved spermatozoa and relative larval yield.

Diluent	Cooling method	Viability of sperm (%)	Motility	Relative larvel yield(%)
A	1	61.4	±	34.4
	2	65.4	±	3.8
	3	55.3	±	1.9
B	1	72.7	±	45.9
	2	57.7	±	6.7
	3	52.2	±	1.9
C	1	77.5	+	12.4
	2	72.5	+	1.0
	3	75.5	±	0

Diluent
A : 8% DMSO
B : 8% DMSO, 50mM sucrose, 6mM reduced glutathione
C : 8% DMSO, 36mM sucrose, 4.3mM reduced glutathione, 20% fetal bovine serum
Cooling method
1 : nitrogen vapor, 2 : methannol-dry ice, 3 : deep freezer (-80℃)

考　察

マガキ精液凍結用の希釈液として岩田ら(1989)は5/6濃度人工海水に4～16%の範囲で溶解した6段階の濃度のDMSOを比較し，8%でもっとも高い受精率を得ている。また，Yankson and Moyse(1991)は0.6%のグリシンを添加した紫外線照射濾過海水に5～20%のDMSOを溶解した希釈液を比較し，マガキの受精率は10%で，浮遊幼生率は20%で最高であったとし，さらにマガキと同属の*C. tulipa*の精液では，0.6%グリシンの補助的添加により無添加に較べ精子の生残率が向上することを確認している。

本研究ではこれらの報告に基づいてDMSOの濃度を8%としたが，希釈液に補助的に加えた凍害保護剤の種類で解凍後の精液の生残率や運動性などの特性に差がみられた。牛胎児血清は哺乳類の培養細胞や微生物の凍結保存に使用され，細胞周辺の水分子の安定化に役立つと考えられている（僧都, 1989)。本研究では生残率・運動性はともに牛胎児血清を含む希釈液Cがそれを含まないA，Bより高い傾向を示したが，これらは相対浮遊幼生率には反映されず，逆にもっとも低い値となった。このことより，希釈液Cで用いた牛胎児血清は，解凍精子の受精能力を何らかのかたちで低下させるか，あるいは正常な胚発生を阻害する可能性があると思われた。

シュークロースなどある種の糖類や糖アルコール類は非透過性凍害保護剤として細胞の脱水に関与した保護作用を示す言われている（Franks, 1985)。また，還元型グルタチオンは赤血球や水晶体（種不明）などの細胞膜の維持作用があり（坂本, 木下, 1989)，さらに大西洋サケ*Salmo salar*（Mounib, 1978)およびウシ（Lindemann *et al.*, 1988）では精子の運動性の保持効果が認められている。本研究でシュークロースと還元型グルタチオンを添加した希釈液Bは，解凍後の精子の生残率や運動性を特に高める効果を示さなかった。しかし，無添加のAに比べ高い相対浮遊幼生率を示したことと解凍精液の凝集がAより軽減される傾向が観察されたことから，以後のマガキ精液凍結保存用の希釈液としては希釈液Bを用いた。

一般的に，微生物や動物の配偶子，培養細胞などを凍結保存する際の冷却法としては，ペレット法，メタノール・ドライアイス法，液体窒素蒸気法，ガラス化法，プログラムフリーザーを用いる方法などがある。カキの精液の凍結保存でこれまで用いられてきた冷却方法は多様で，冷却速度や予備凍結温度に違いがある。本研究では，冷却方法の違いが希釈液の違いよりも相対幼生浮遊率に大きな影響を与えることが示された。

岩田ら（1989）は，8%DMSOを凍害保護剤としメタノール・ドライアイスを用いた冷却法により約100%の相対受精率を得ているが，本研究でメタノール・ドライアイスによる冷却法（方法2）では好結果が得られなかった。岩田らが示す冷却曲線から読みとれる冷却開始10分後の温度は約－25℃であるが，本研究の冷却方法2では－67.5°Cで，方法3でも－36.5°Cであり，急速に冷却されたため－80℃付近での保持時間が30分以上に達し，この間に精子に何らかの低温障害等が発生した可能性も考えられる。もし，本研究と岩田ら(1989）との結果の差が用いた器材の仕様やストロー本数等の差で生じる冷却速度の違いだけによるものであるなら，メタノール・ドライアイス法による場合も冷却曲線の確認は欠かせないことになる。

液体窒素保存容器内で冷却を行う液体窒素蒸気法は冷却した試料をそのまま液体窒素中に浸漬して保存できるので，特別な器機や資材を必要とせず，実施がもっとも容易で，時間当たりの処理試料数も多い利点がある。

4-1-2　液体窒素蒸気による冷却方法の検討

方　法

精子を下記の条件により液体窒素保存容器内の蒸気中で3分間冷却後，液体窒素中に保存した。ここでは解凍後の精子生残率だけを比較した。

条件Ⅰ：ビニール製チューブ（内径4mm，長さ約

30mm）を束ねて作成した支持台にストロー管どうしが接触しないように差しこみ，下端が液体窒素表面から5 cmの距離になるように垂直に固定して蒸気に露出させた。

条件Ⅱ：同じく10cmの距離になるように固定して蒸気に露出させた。

条件Ⅲ：ストロー管を合成樹脂製の収納管(内径9 mm，長さ約120mm）に入れて，下端が液体窒素表面から5 cmの高さになるように垂直に固定した。

なお，長期保存用の精液以外は条件Ⅰにより冷却した。

結　果

条件ⅠとⅡでは計測開始後10～25秒の間に過冷却後の凝固潜熱の放出によって5℃以上の顕著な温度上昇がみられる（Fig. 70）が，条件Ⅲでは凝固潜熱の放出がこれらより高温で開始され，冷却中の温度上昇はほとんど見られなかった。各条件内の生残率のばらつきは比較的小さく，もっとも冷却速度が遅い条件Ⅲでは生残率が74.4%を示し，冷却速度が速い他の二法よりも明らかに高かった（Table 28）。

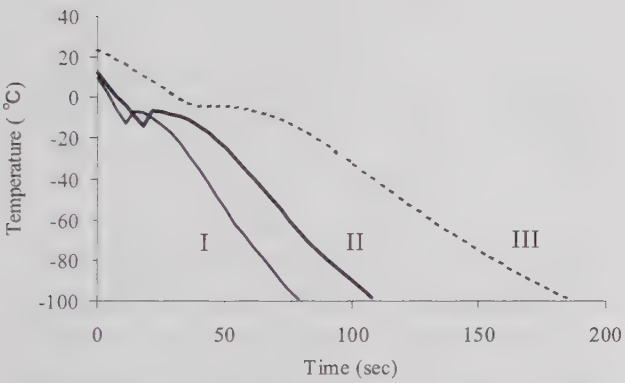


Fig. 70. Temperature changes of sperm in the straws cooled in liquid nitrogen vapor. Ⅰ;exposed, 5 cm above LN_2 Ⅱ;exposed, 10 cm above LN_2, Ⅲ;in sheath, 5 cm above LN_2

Table 28. Viability and cooling rate of sperm cooled in nitrogen vapor

Cooling condition until-60℃	Viability of sperm(%) mean	s.d.	n	Averege cooling rate (℃/min)
Ⅰ	63.4	5.0	5	-79.8
Ⅱ	59.9	7.1	5	-57.5
Ⅲ	74.4	5.9	5	-38.2

考　察

Bougrier and Rabenomanana (1986)は10%DMSOを凍害保護剤として用い，液体窒素液面の5 cm上方の蒸気中で3分間冷却後液体窒素中へ保存することにより46.9～92.4%の相対受精率を得ているが，冷却速度等の詳細は不明である。本研究では，液体窒素蒸気中でのいくつかの冷却条件で精子を凍結することを通じ，冷却速度の違いにより解凍後の精子生残率が異なることを指摘した。条件Ⅲと他の2条件の間でみられる凝固潜熱の放出過程の違いからこの2者間では凍結時における精子細胞内外での氷晶形成状況が異なっていると推察されるが，生残率の平均値の差は15ポイント以下であり，少なくとも生残率に対してはこれらの条件の違いが決定的に作用するとは言えないと考えられた。また，条件Ⅲにより同一の収納管に複数本のストロー管を収納して冷却する場合，ストロー管と収納管，あるいはストロー管どうしの微妙な接触具合の差によって冷却曲線の再現性が損なわれ易いことが予備実験で認められ，個々のストロー管を均一条件で冷却する必要がある実験条件としては不適であると考えられた。さらに，液体窒素表面からの距離は小さい方が外気の影響を受けにくいと考えられ，以後の実験での冷却は条件Ⅰで行った。

4-1-3　冷却時の精子濃度の検討

方　法

カキから採取した直後の精液（＝原精液，濃度2.5×10^{10}精子/mL）を10^6，10^7，10^8精子/200 μLの濃度に希釈して凍結保存し，解凍後の生残率とそれぞれの濃度で媒精したときの受精率を新鮮精子と比較した。精子濃度は，原精液を一定量の1%ホルマリン海水で固定後，約10万分の1に希釈して顕微鏡下で血球算定盤により計数して求めた。

結　果

10^8区の精子生残率の平均値は新鮮精液で98.2%であったが凍結精液では73.2%であり，この値は冷却時の精子濃度が低くなるにつれてさらに低下した。受精率の平均値は10^8区で新鮮精液の36.2%に対し凍結精液では28.0%であったが，10^7区では新鮮精液30.3%に対し凍結精液では1.5%と急激に低下した。また，新鮮精液でも10^6区では受精率が4.3%まで低下した（Table 29）。

考　察

マガキ精液の冷却時の精子濃度について，Bougrier and Rabenomanana (1986) は本研究とは異なる種類

Table 29. Effects of concentration of sperm at cryopreservation on viability and fertility.

Concentration (spermatozoa per 200 μL)	Fresh sperm(%)				Cryopreserved sperm(%)			
	Viability		Fertility		Viability		Fertility	
	mean	s.d.	mean	s.d.	mean	s.d.	mean	s.d.
10^8	98.2	3.5	36.2	3.3	73.2	8.8	28.0	2.0
10^7	—	—	30.3	1.9	45.2	15.8	1.5	0.3
10^6	—	—	4.3	1.8	18.4	8.0	0.2	0.2

の希釈液を用い1/5～1/20の希釈率のうち1/15が有意に受精率が高かったと述べている。本研究では，採精時の海水の混入の可能性や媒精に必要な精子数を求める必要性を考慮し，希釈の指標は原精液の希釈率ではなく精子濃度（ストロー管あたりの精子数）とした。予備実験からは新鮮精液の生残率が希釈により低下することは観察されなかったが，凍結精液では冷却時の精子数を少なくするにつれて明らかな生残率の低下がみられた。

受精率の評価は容器内の卵密度や卵あたりの精子数などの条件により異なると考えられるが，本研究の条件下では凍結時の精液濃度で10^8精子/200 μLから10^7精子/200 μLにかけて生残率は2分の1も低下していないが，受精率は18分の1程度まで急激に低下した。Kurokura *et al.* (1990)は凍結前後のマガキ精子の生残率および形態の変化からだけでは極端な受精能力の低下を説明しえないとしていて，本研究における結果もこれを裏付けるものであった。

これら，本条件下における生残率と受精率から，冷却時の精子濃度は最低でも10^8精子/200 μLは必要であり，本研究全般を通じて精液の採取直後の濃度は最高でも6×10^9精子/200 μLであったことから，生物検定への利用など多数のロットが必要とされる場合でも冷却時の希釈倍率は十倍から数十倍が限界であると考えられた。本研究の結果から得られた精液の適切な希釈倍率は，希釈液の組成は異なるものの，Bougrier and Rabenomanana (1986) の結果とほぼ一致した。

4-1-4 卵あたり必要な精子数の検討

方 法

新鮮および凍結精液の媒精時の精液量を調節することにより10～1,000精子／卵の割合で媒精し，受精率と浮遊幼生率を比較した。

結 果

新鮮精液を用いた媒精では，全体としては卵あたりの精子数の減少に伴い受精率がやや低下する傾向があるものの，10精子／卵でも41%の受精率を示した。一方，凍結精液の場合は100精子／卵でも2%以下であり，1,000精子／卵で初めて新鮮精液並みの受精率に達した。浮遊幼生率は受精率によく対応していた（Fig. 71）。

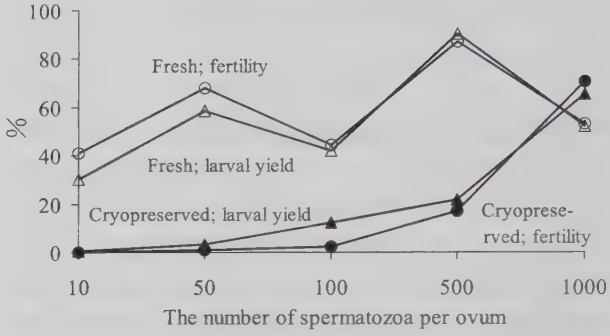


Fig. 71. Effect of the number of spermatozoa per ovum on fertility and rate of larval yield.

考 察

媒精時の卵1個あたりの凍結精子数について，岩田ら（1989）は30mL中に卵を10^4個という条件で10^4～10^5精子／卵で新鮮精液にほぼ匹敵する受精率が得られたとしている。本研究では受精率は500精子／卵以下では新鮮精液に及ばず，1,000精子／卵で初めて新鮮精液並みの受精率を示した。媒精時の海水中の精子濃度により結果は異なると思われるが，本条件下では1個の卵の受精には冷却時の数で最低10^3の精子が必要であると考えられた。また，分裂速度は測定していないものの，浮遊幼生率が受精率によく対応していることから，解凍精液に含まれる各種凍害保護剤が受精後の卵の初期発生を大きく阻害することは無いと推察された。

4-1-5 長期保存精液による媒精と幼生飼育

方 法

上記希釈液B，冷却条件Ⅲにより1991年8月に保存した精液を約4年後の1995年9月に解凍し，精子の生

残率と媒精後の受精率，正常D型率，媒精6日後の生残率と殻長を新鮮精液と比較した。

結　果

精子生残率，受精率と浮遊幼生率をFig. 72に，正常D型幼生率と飼育6日後の生残率をFig.73.に示す。精子の生残率は新鮮精液で98.2%であったのに対し，凍結精液では40.3～53.5%であった。受精率は同じ実験区でもストロー間でばらついたが，平均値で比較すると新鮮精液の54.2%に対し，凍結精液では31.4%であり，相対受精率は57.9%であった。浮遊幼生率の平均値は新鮮精液で23.2%，凍結精液で22.5%であった。

凍結精液を用いた場合，正常D型率，6日後生残率とも新鮮精液を用いた場合よりやや低い値を示したが，いずれも77%以上であった。一方，6日後幼生の殻長の平均値は新鮮精液区で95.2 μm，凍結精液区で99.9 μmであり（Table 30），t検定によって両者間に1%以下の水準で有意差が認められた。

Table 30. Shell length of larvae 6 days after fertilization obtained with fresh and long-term cryopreserved sperm.

	Mean (μm)	S.D. (μm)	n
Fresh	95.2	7.7	86
Cryopreserved	99.9	6.7	138

考　察

ウマの凍結精液は半永久的に保存できると考えられ，15年貯蔵したものでも運動性は凍結直後のものと変わらない（四之宮，1989）。本研究では，短期間保存した凍結精子の生残率がTable 27，Table 28およびTable 29など数例で60～70%程度であったのに対し，長期保存精液ではこれらより低い傾向を示し，受精率も新鮮区の6割以下であった。4年後に至るまでの途中経過を調べていないので，全期間を通じて経時的に変化しているのかは明らかではないが，液体窒素温度でも長期間の保存では精子が劣化するものと推察された。一方，媒精33時間後の浮遊幼生は新鮮精液区，凍結精液区ともに殆どがD型幼生となっていて，この時点での正常D型幼生率と6日後の幼生の生残率は各々78.0%，77.4%であり，新鮮精液を用いた場合より下回りはしたが実用に耐える値であった。媒精6日後の凍結区幼生の殻長の平均値は，新鮮区のものより有意に大きなものとなった。媒精後2日目の幼生の飼育密度は凍結区は8.8個/mLに対し新鮮区の10.3個/mLであり，この時点で両区とも5個/mLに調整したがその後の生残も

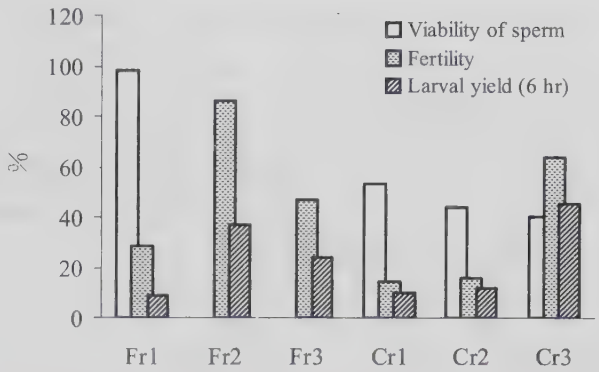


Fig. 72. Viability of sperm, fertility and rate of larval yield obtained with fresh and long-term cryopreserved sperm. Fr1-3; 3 replicates of fresh sperm. Cr1-3; 3 replicates of cryopreserved sperm.

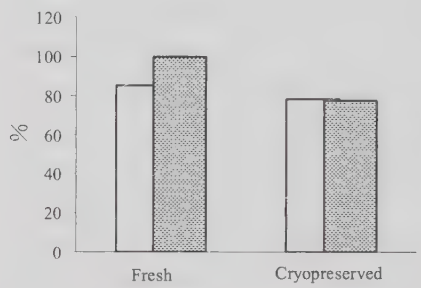


Fig. 73. Early larval development rate obtained with fresh and long-term cryopreserved sperm. Open:Normal D-shaped larvae. Solid:Survival rate at 6 days.

新鮮区の方が高めであった。このような飼育密度の違いから殻長の差が生じたことが考えられるが，少なくとも凍結区の幼生が新鮮区より成長が劣るということはなかった。これらのことから，媒精後の発生進行に寄与した解凍精子のうち多くのものはその後の初期発生に大きな支障を来すほどの損傷は受けていなかったと考えられ，長期保存精液から得た幼生の実用性が確認された。

4-2　幼生の凍結保存

4-2-1　各発生段階での凍結保存の可能性の予備的検討

マガキの未受精卵，胚や幼生の凍結保存についてはいくつかの研究例があり（Chao *et al.*, 1997; Renard, 1991; Chen *et al.*, 1989; Liu and Robinson, 1997），Chao *et al.*（1997）は2MのDMSOおよび0.06Mのトレハロースを凍害保護剤とする2ステップ法によりカキの後期胚と初期幼生で解凍後に62～75%の生残率を得ている。

本研究ではマガキの卵や幼生の凍結保存について，

まず各発生段階での凍結保存の可能性を予備的に検討するため，未受精卵～ヴェリジャー幼生の解凍後の発生率や運動性を調べた。

尚，精子の凍結保存の節ではDMSOの濃度はパーセントで表示したが，幼生の凍結保存では多くの論文でモル濃度で表示されているため，比較が容易となるよう本研究でもモル濃度表示とした。

方　　法

広島湾内で養成した1～2年令のマガキを用い，切開法により卵と精子を採取して受精させ，21～25℃の海水中で発生させた。未受精卵，受精1時間後の卵，16細胞期胚，トロコフォア初期～後期，ベリジャー期の各発生段階のものを下記の実験に用いた。

凍害保護剤として1.0M のジメチルスルホキサイド（DMSO）および250mMのトレハロースを含んだ海水に各発生段階のマガキを浮遊させゆるやかに混合した後に，400mLを牛精子凍結保存用ストロー管に封入してポリエチレン製の袋に収容した。ストロー管を収容した袋はメタノールに浸し，汎用冷却機（LAB COOL LC-260（東洋科学産業㈱製）により約－1℃／分の速度で冷却，植氷のため－5℃で5分間静置後再び同速度で冷却し，－35℃に到達直後，または液体窒素中に1時間以上保存後に水道水中で解凍した。解凍したストロー管の内容物をマルチウェルプレートに取り，実態顕微鏡により分裂率や運動率を計数した。解凍した未受精卵についてはオープニング20μmのプランクトンネットを用いて濾過海水で洗浄することにより凍害保護剤を除去し，新鮮精液で媒精して発生の状況を観察した。

結　　果

解凍後に媒精した未受精卵では全く発生がみられず，解凍した受精卵でも分裂が確認できたものは2％以下であった（Fig. 74）。わずかに分裂した受精卵もその殆どは胞胚期前に分裂が停止した。また，16細胞期の胚は解凍後に約18％で卵割が進むものの，これらは全てが割球がいびつな奇形で，浮遊幼生は得られなかった。

考　　察

解凍後の状態から，未受精卵，受精卵や16細胞期の発生能を保持したまま凍結保存するのは相当困難であると思われた。そこで，成功の可能性がより高いと思われる浮遊幼生の凍結保存方法について検討することとした。一般に，凍結保存による保存性は，凍害保護剤の種類の他にその濃度，凍結方法など，種々の要因に影響される。そこで，本研究ではこれ以降，マガキ

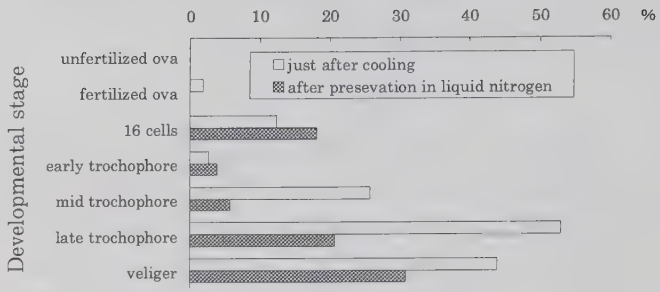


Fig. 74. Survival after thawing in several developmental stages.

浮遊幼生の凍結保存技術を開発するために幼生の発生段階による耐凍性の変化，保存用溶液の海水濃度および発生温度について検討した。これらの研究は，1993～1996年の間に切開法による人工受精から得た幼生を使用して行った。

4-2-2　幼生の発生段階による耐凍性の変化

方　　法

広島湾内で養成した1～2年令のマガキから卵と精子を採取して媒精後21℃海水中で発生させ，9，12，15，18，21時間後に凍結保存実験に供した。3,000～4,000個/mLの濃度で胚または幼生を含んだ海水を，3.0MのDMSOおよび500mMのトレハロースを含む海水と徐々に等量混合したのち牛精子保存用ストロー管に封入，これを自動植氷装置付きのプログラムフリーザー（大陽酸素（株）製CM-21）へセットし，20分の平衡時間の後，Fig. 75に示す温度行程で冷却した。すなわち，各ストロー間の温度差を無くすため10³℃で10³分間経過させた後，－1.0℃／分の速度で－8℃まで冷却して温度降下を停止した。そのまま3分間おいた後，細胞外に微小な氷の粒を生じさせるための植氷操作を15分間かけて行った。その後再び－1.0℃／分の速度で冷却をしてゆき細胞内の脱水を進めていった。植氷操作直後から－40℃までの間の各冷却段階で各々2本のストローを取り出し，直ちに解凍した。－35℃および－40℃では別の2本のストローを液体窒素中へ浸漬し，1時間以上保存したのち解凍した。解凍はいずれもストローを水道水流水中に1分以上浸漬することにより行った。

解凍した胚・幼生浮遊液をマルチウェルプレートに採取し，海水で10³倍量まで徐々に希釈した後顕微鏡下で外観を観察し，運動性のある胚・幼生と無い胚・幼生を各々計数した。冷却前の幼生の一部は3％海水ホルマリンで固定し，光学顕微鏡を用いて発生段階を確認した。

結　果

水温21℃で発生させた胚または幼生の発生段階を固定サンプルから判断した結果，胞胚期～殻および面盤形成中のトロコフォア幼生期に該当した（Table 31）。発生段階が異なるこれらの胚・幼生を各冷却段階で解凍した場合，封入直後には全ての発生段階で90%以上の運動率を示すが，冷却の進行に伴い運動率は低下してゆく。特に媒精9時間後の胞胚期幼生は冷却の進行に伴う運動性の低下が全ての発生段階のなかでもっとも著しかった（Fig. 76）。すなわち，顕微鏡下の観察では植氷後にはすでに遊泳が異常となり遊泳速度も低下し，表面に凹凸が目立つ外観を示す。一方，媒精15時間後のトロコフォア初期幼生は，冷却の進行に伴う運動性の低下が全ての発生段階のなかでもっとも少なく，顕微鏡観察でももっとも正常に近い外観を示した。これらの解凍胚・幼生を解凍後3時間まで観察したが，形態や遊泳状態が時間とともに向上することは確認されなかった。

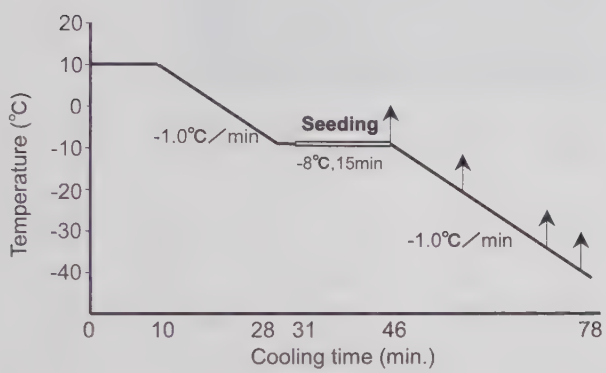


Fig. 75. Cooling program in Exp.1. Arrows indicate sampling points

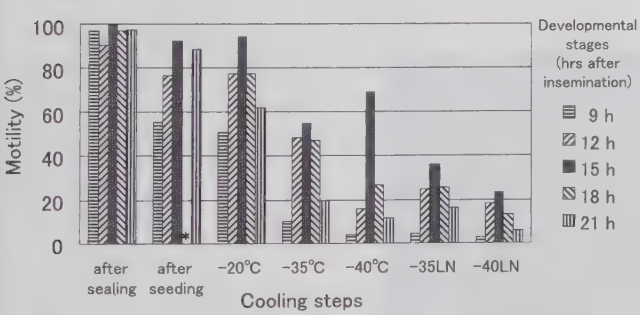


Fig. 76. Changes in motility of post-thaw larvae of different developmental stages during the cooling process. All the tested larvae were obtained from the same batch at 21℃. -35LN and -40LN : larvae were kept for more than one hour in liquid nitrogen after reaching -35℃ and -40℃, respectively.
＊ : data was lost.

Table 31. Hours after fertilization with developmental stage at 21℃.

Hours after fertilization	Developmental stage
9	Early blastula
12	Blastula ～ Gastrula
15	Early trochophore
18	Trochophore forming the shell gland
21	Trochophore forming the shell and velum

考　察

発生段階により耐凍性が異なることはいくつかの海産無脊椎動物で指摘されている。Asahina and Takahashi (1979)はエゾバフンウニ *Strongylocentrotus intermedius*で胞胚期以降の胚について凍結保存時の耐凍性は発生が進むほど高まることを示した。Toledo *et al.* (1989)はヨーロッパイガイ*Mytilus edulis*を用い，トロコフォア幼生が卵割期胚よりも高い耐凍性を持つことを示した。一方，アズマニシキガイ*Chlamys farreri*では，ベリジャー幼生は液体窒素からの解凍後も生残するが，トロコフォア幼生は生残しないとされる（Xue, 1994）。本研究では，桑実胚期から殻およびベラム形成中のトロコフォア幼生期までのマガキについて検討し，発生段階で耐凍性が変化することを明らかにした。すなわち，胞胚～嚢胚にかけての胚や貝殻腺形成後のトロコフォア幼生では耐凍性が低く，これらの間に位置する貝殻線形成直前のトロコフォア期でもっとも耐凍性が高かった。このように，凍結保存に最適な発生段階は種によって異なるものと考えられる。

Renard (1991)はマガキ2～4細胞期胚体の超微細構造の観察から，これらの胚体の冷却に対する感受性は細胞内のvesicular inclusionの存在と関連すると述べている。本研究ではトロコフォア幼生は貝殻線の形成期では耐凍性が低下したが，これが特定の器官や細胞小器の形成等と関わりがあるかどうかは今後さらに研究する必要である。

4-2-3　凍害保護溶液に用いる海水の濃度が及ぼす影響の検討

方　法

海水温26℃で媒精し，9時間後の貝殻腺形成直前に達したトロコフォア幼生を採取して，実験に供した。DMSOおよびトレハロースを含む蒸留水を1分間隔で1/5量ずつ幼生浮遊液に徐々に添加することにより，海水の最終濃度が1/4，1/6，1/8，1/10および1/30である混合液を作成した。いずれの混合液もDMSOおよび

トレハロースの最終濃度が各々1.0Mおよび250mMとなるように予め調節した。幼生は2,000～28,000個/mLの範囲の密度であった。これらの混合液を前出のストロー管に封入し，実験1と同様に冷却した。ただし，植氷温度は－5℃とし，－35℃で5分間保持したあと液体窒素中で保存した。24時間以上保存後，前出の要領で各々2または3本のストローを解凍し，幼生の観察・計数を行った。異なるストローから解凍した幼生を，オープニング20μmのプランクトンネットを用いて濾過海水中で洗浄することにより凍害保護剤を除去したのち，4日間飼育した。凍結保存に用いた幼生の総数に占める殻のある幼生の割合を有殻幼生率として算出した。

海水濃度1/4の混合液で凍結後解凍した幼生の一部は，凍害保護剤を除去後Karnovsky液で固定し，脱水・真空乾燥後，金アルミ蒸着を施し走査電子顕微鏡（日立製S-2460N）で外部形態を観察した。

結　果

異なる海水濃度で凍結した幼生の解凍4日後の運動率と有殻率をFig. 77に示す。各濃度での運動性の平均値は25.8%から47.1%の範囲にあったが，統計的な有意差は検出されなかった。一方，有殻幼生率は海水濃度の低下と伴に明らかに低下した。1/4区では運動している解凍幼生の約10%が殻を形成したが，1/10区では約0.2%だった。

未凍結および解凍後幼生の走査電子顕微鏡像をFig. 78，Fig. 79，Fig. 80に示す。解凍後幼生では，未凍結幼生と同様の滑らかな表面を呈するもの（Fig. 79）と凹凸の激しい表面を呈する幼生(Fig. 80)がみられた。

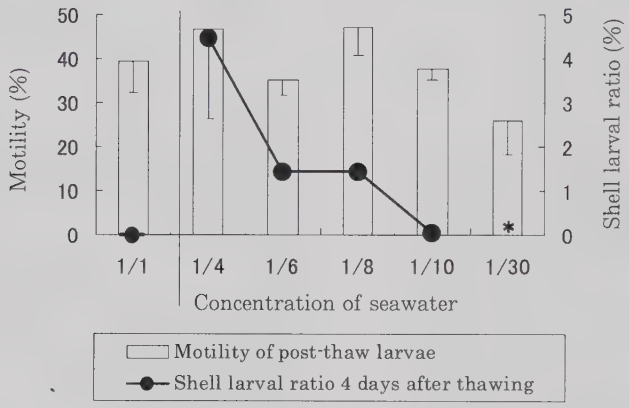


Fig. 77. Motility and shell larval ratio of larvae cryopreserved in various concentrations of seawater. Shell larval ratio : the ratio of the number of larvae with shell to that of cryopreserved larvae.
＊ : Post-thaw larvae were not reared Bars indicate the standard deviations.

Fig. 78. Non-frozen normal larva making a shell gland. Fixed after removal of cryoprotectants.

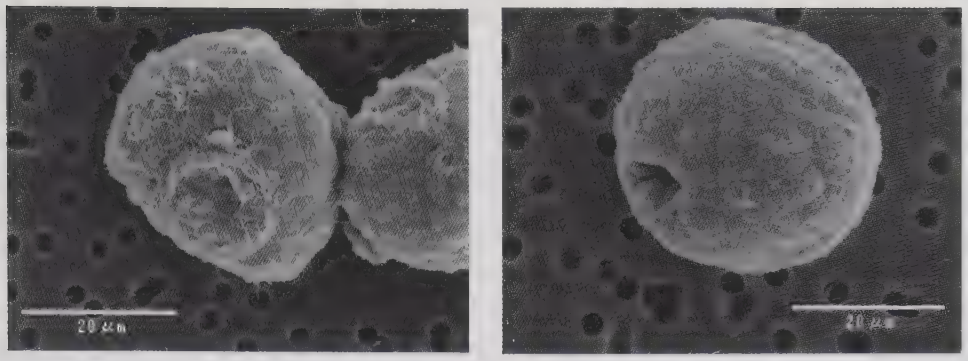


Fig. 79. Post-thaw larvae showing a smooth surface. Trochophore larvae just before forming the shell gland were used. Fixed after removal of cryoprotectants.

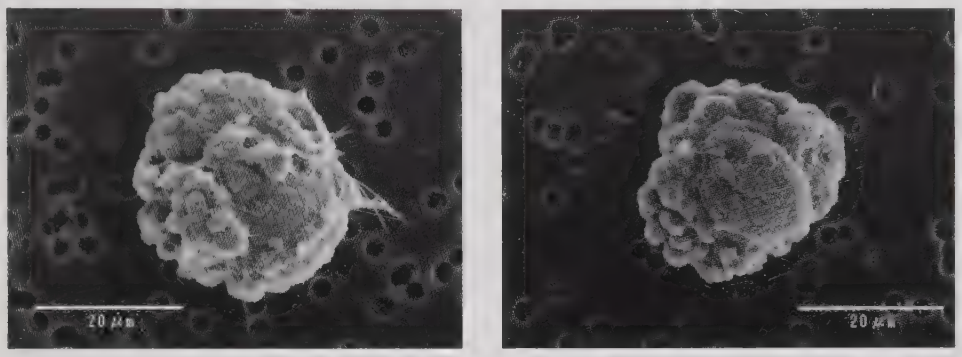


Fig. 80. Abnormal post-thaw larvae with a rough surface. Trochophore larvae just before forming the shell gland were used. Fixed after removal of cryoprotectants.

考　　察

凍害保護剤の溶媒として無希釈海水を使用した場合（1/1区）は解凍後に殻を形成する幼生は殆ど得られなかったが，保存液の海水濃度を1/4にしたところ殻を形成する幼生が得られた。本研究では海水濃度が1/4以下の場合の有殻幼生率を求めたが，有殻幼生率は海水濃度と正の相関を示し，結局1/4濃度でもっとも高い運動率と有殻幼生率を得た。凍結保存に最適な海水濃度が1/1〜1/4の間に存在する可能性が残されているわけだが，これらの範囲の海水濃度では1/4以下の場合と植氷温度が異なり，同時に冷却して比較することは不可能であった。そのため，1/1〜1/4濃度区については今後繰り返し実験を充分に行って検討することが必要である。

冷却および凍結保存条件下では細胞はその外部環境変化に加え，細胞質の塩分上昇，イオンバランスの激しい変化，氷晶形成やその発達による構造的・体積的影響などの内部環境の変化を受けると考えられる。Renard(1991)は冷却されたマガキ胚体細胞の原形質膜構造が崩壊することにより微絨毛が破壊されることを示した。本研究で解凍後に激しい凹凸を示した幼生では細胞の原形質膜の機能的損傷が示唆され，解凍後の外観が未凍結幼生に近いものがその後主に殻を形成し，凹凸の激しい幼生は殆ど殻を形成しないものと推察される。凍結に伴う細胞外・細胞内環境の変化が細胞膜の構造的・物理的変化とどのように結びついているのかは今後の研究を待つ。

4-2-4　冷却前の発生温度の影響

方　　法

水温26.5℃の天然海域で養成されていた親貝から卵と精子を採取し，媒精後に21℃，25℃および29℃の水温でそれぞれ発生させた。各々の水温について，貝殻腺形成直前のトロコフォア幼生を用いて，海水，DMSO，トレハロースの最終濃度がそれぞれ1/4, 1.0M, 250mMの幼生浮遊液を作成して前出の方法で冷却・凍結保存を行った。液体窒素中で8ヵ月間保存後解凍し，凍害保護剤を除去した幼生を2.5Lの濾過海水（26℃）で *Pavlova* sp. および *Chaetoceros* sp. を餌料として飼育し，生残率と形態的に正常な幼生の占める割合（正常幼生率）を計数した。

結 果

解凍後2日目の生残率は全ての実験区でほぼ同じ(12～13%)だが，正常幼生率は21℃区で18%ともっとも高く，29℃区は3%ともっとも低かった（Fig. 81)。また，29℃区は解凍後4日目には生残率も他の2区より低下した。21℃区は解凍後4日目まではもっとも高い生残率を示したが6日目では25℃区が生残率，正常幼生率とも最高の値を示した。また，これらの幼生の中には消化管内に餌料を取り込んでいる幼生がいることが確認できた(Fig. 82)。さらに幼生の飼育を続けた結果，1個体の付着稚貝を得ることができ，成貝まで生き残った。

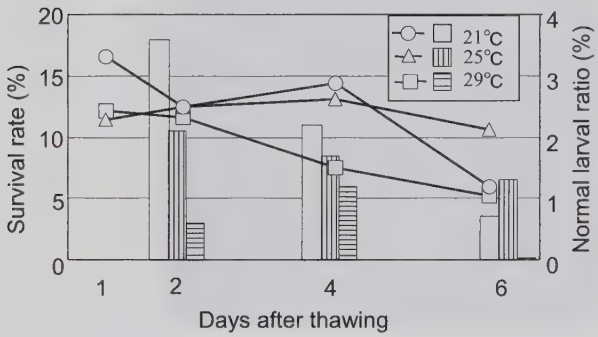


Fig. 81. Effect of rearing temperature of larvae prior to the preservation on changes in survival rate and normal larval ratio. Bars : ratio of normal larvae to cryopreserved larvae. Lines : survival rate to cryopreserved larvae.

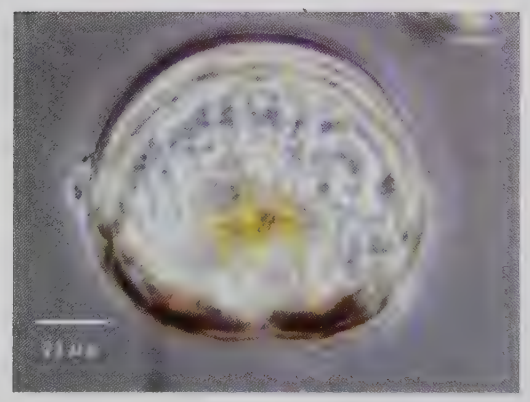


Fig. 82. Larva at 7 days after thawing after having fed on phytoplankton. Trochophore larvae just before forming the shell gland were used.

考 察

微細藻類では低温下での予備培養により耐凍性が向上する例が知られている(Watanabe, 1987)。我々の予備実験では，マガキは18℃以下では正常に発生しなかった。本研究で，解凍幼生の生残率と正常幼生率は，解凍4日後までは凍結前の水温と負の相関関係にあった。しかし，解凍6日後では25℃の生残率がもっとも高い値となった。これらの結果は凍結前の発生温度が解凍後の生残に影響することを示し，また，その影響は解凍後の幼生の発生段階により異なる可能性が示唆された。凍結用幼生の最適な飼育水温を決定するためには例数を増やすとともにさらに長期飼育での影響を確かめる必要がある。

本研究では凍結保存後に解凍した幼生を飼育することにより得られた成貝はわずか1個体であったが，解凍後の飼育はマガキの産卵期前に行っていて，さらに，用いた海水は0.2μmカートリッジフィルターで濾過していることから，外部からの幼生や稚貝が混入する可能性は無く，確かに解凍幼生が付着まで至った結果と考えられた。このことから，マガキ幼生の凍結保存技術はさらなる検討により実用化を期待できると考えられた。

第5章 総合考察

地方集団間の特性評価

広島，宮城，有明，五島の天然海域で採苗・採取した各母貝集団（P_0）とこれらから作出した次世代（P_1）の双方で全重量の増加速度は宮城産がもっとも大きく有明産と五島産がもっとも小さかったこと，P_1の斃死率は五島産で高く有明産は悪条件下でも斃死しにくいこと等は，Imai and Sakai (1961)が一対交配により示した結果と矛盾するものではなく，それぞれの地方集団が現在でも個別の遺伝資源として独自の形質を保ちつつ存在していることを強く示している。

Ozaki and Fujio (1985)は北海道，宮城，広島，静岡，広島の各マガキ地方集団について10^3遺伝子座を用いたアイソザイム分析から，これら集団間の遺伝的距離は0.0023～0.0099であり遺伝的差異は小さいものであると報告しているが，カキの生理的作用，活性，耐性や生化学的，血清学的特性は10～100kmのスケールという，アイソザイム分析で差異化できる距離（数千km）よりも小さい距離でも変異を示すといわれる(Hedgecock, 1995)。本研究で用いた地方集団の産地は沿岸に沿った距離が約200～1,600kmであるが，成長特性のように地理的に連続して変化している形質がある一方で，斃死特性のように距離的にもっとも短い200km程度である有明・五島間で大きな差を示す形質もあり，地方集団間の形質は必ずしも現在の地理的条件に沿って連続的な変異を示すものではない。その理由としては，暖流と寒流それぞれの影響を受け，幾つかの島が南北に連なった地形を有するため環境の変化が複

雑で地理的に必ずしも連続しないといった日本沿岸の環境特性とともに，過去の地殻変動や海水流軸の変化，海進・海退などの影響も蓄積された結果であると考えられる。

一方，広島産と宮城産の種苗を用いて形質に及ぼす産地の違い（遺伝的要因）と養成水域の違い（環境的要因）の影響を解析した結果からは，遺伝的要因と環境的要因から受ける影響は形質間で一様では無いことが示された。さらに，養成場所や測定月により産地間の差の現われ方が異なる形質が存在することが明らかとなった。殻長・殻高に対する殻幅など，殻の長さという同じ範疇の形質間でも各主効果やそれらの交互作用が及ぼす影響の強さが異なることが示されたことはカキの形質の形成の複雑さを物語っていて，地理的特性だけではなく，生物的特性から見た場合も変異の実態が複雑であることを示唆する。

このように比較的狭い範囲に独自性をもって生息している地方集団は，気候変動あるいは人為的な環境改変等により再生産がひとたび脅かされることになれば，広範囲に分布している集団に比較して消失（絶滅）する危険性が大きいと考えられる。

北海道の地方品種としてImai and Sakai（1961）はサロマ湖産のカキを，Ozaki and Fujio(1985)は厚岸産のカキを用いたが，サロマ湖や厚岸湖などにもともと生息していたこれらのいわゆるナガガキは，おそらく乱獲や湖口開削，埋め立てなどの環境改変により現在ではすでに消失したと考えられていて，本研究でも試料として入手することができなかった。現在ではこれらの地域では主に宮城産の種苗を用いた養殖がなされているのが現状であり，国内のマガキ地方集団の中でもっとも成長が速く，冬季に結氷する寒冷な水域で再生産し，潮下帯にカキ礁を形成して生息していたと推察される（五嶋ら，1995）北海道の地方集団は，残念ながら完全に失われたものと考えられる。

近縁種との交配特性

遺伝資源としてマガキを考える場合，近縁種との交雑特性は大きな意味を持つ。本研究の第2章では，ミトコンドリアDNAにある16SrRNA遺伝子領域がシカメ型を示し（mtシカメ型カキ），calmodulin遺伝子の第3イントロン領域（CaM intron 3）の型が互いに異なるカキをマガキと交配した。その結果，自然交雑により生じると考えられるDNA型の稚貝を得たと同時に，従来受精しないと言われていたマガキ♀×シカメ♂の交配からも低率ながら稚貝が生じることを示した。

天然でもこれらの交雑が成立して交雑個体が生き残るとすれば，核DNAがマガキとシカメのモザイク状態である個体が存在する可能性があり，それは，ゲノム中の1本の染色体上のＤＮＡ領域であるCaM intron 3の型だけからは判別できない。16SrRNA遺伝子とCaM intron 3がともにマガキ型を示す個体でもシカメの核DNAの一部を保有している個体が存在する可能性がある。今後，純粋なマガキとこれら交雑個体の判別や交雑実体の把握には，サケ科魚類で用いられているPINE分析（上田，2000）など，複数の遺伝子座を利用して解析する手法を用いる必要がある。もし，交雑個体が不稔である場合は，マガキやシカメと交雑個体間のDNAの交流は起こらず，交雑個体を親とした人為交配も成り立たないので，これらのカキの判別さえ可能であれば，遺伝資源保存という観点からの問題は比較的小さいといえる。

一方，もしも交雑個体が稔性を有し，天然海域で交雑個体間やマガキ，シカメとの間でDNAが交流しているのであれば，分類学的な論議も含め，遺伝資源としての様相はたいへん複雑なものとなり，その認識には充分な注意を要することになる。幸いシカメは国内では有明海以外では生息が確認されていないため，このようなことは有明海のマガキ集団でだけ問題となるが，有明産のカキを他の地方集団の生息地へ移入して交雑がおこった場合，知らないうちにシカメのDNAが移入先の地方集団中に広がる危険性がある。

さらに，本研究でマガキ♀×mtシカメ型カキ♂の交配組の一部で雄のmtDNAの受精卵への侵入が示唆されたことは，核ゲノムだけではなく，ミトコンドリアゲノムのモザイク現象にも注意を要することを示す。

遺伝率の推定

現在のマガキ養殖，特に瀬戸内海では，夏～初秋にかけて養殖カキが斃死することがしばしば問題となっていて，斃死耐性の高いカキの作出が望まれている。地方集団などの遺伝資源は育種的な観点からは育種素材としての重要な意義があり，本研究の第3章では広島産および有明産の地方集団を用いて選抜育種の効果の指標となる狭義の遺伝率をもとめた。その結果，幼生期・稚貝期の殻長では用いた卵の質や飼育環境のかたよりなどの共通環境要因あるいは優性効果などが大きく影響していると思われたものの，出荷初期までの生残率は全重量よりも高い選抜効果を期待できると考えられた。天然海域に生息するカキの斃死要因としては，高水温や低塩分の長期間にわたる継続，夏場の底層の貧酸素化，成熟・産卵に伴う生理的条件の急激な変化，寄生・害敵生物による攻撃など多くの要因が考えられる。斃死に関する遺伝率が高いということは斃死要因への応答に関して集団内での遺伝的変異が大き

いことを示唆し，これら多種多様な斃死要因に対抗して集団として安定的に存続してゆくうえで遺伝的な多様性が必要であった可能性が考えられる。特定の環境のもとでの選抜育種によりカキの斃死率を低下させることが可能であるとしても，そのために，遺伝的多様性を保持した貴重な素材としての地方集団の存続が脅かされるとすれば問題である。現在のマガキ養殖のように天然海域で養成が行われている場合，元来の地方集団と育種により作出された系統は，産卵期には互いに異なる海域で養成するなど，交雑を極力避けるための工夫が不可欠となる。さらに，広島湾のように海域内に存在するカキの現存量の95%以上を養殖カキが占めている場合は，養殖カキが海域内のカキの再生産を担っているものと考えられ，こういった海域での作出系統の急激な頒布は元来の地方集団の遺伝的多様性の喪失につながることを認識しておかなくてはならない。

遺伝資源としての管理と保存

独自の特色を有し，全体としては多様性に富んでいる反面，ともすると消失する危険性が大きい日本のマガキ地方集団を元来の生息環境中で保全してゆくためには，幾つかの点に関して注意が必要である。

マガキ地方集団はこれまでも水産資源として積極的に利用されてきた一方，その管理は充分なされてきたとは言えず，結果として先の北海道地方集団のように消失してしまった地方集団もある。独自の特色を有する地方集団は一度消失すると同じ特性をもつ集団へ回復させるのは不可能である。また，消失しないまでも，地方集団の個体数の極端な減少は，集団中での頻度が低い遺伝子の喪失や，びん首効果による遺伝子頻度の変化を招く危険性がある。水産資源としての積極的な利用は乱獲に陥る危険性がある反面，採苗予測や身入り・斃死調査を通じて資源の動態を常に注視できる利点もあり，管理方策の策定・運用如何によっては優れた遺伝資源保全方法になると考えられる。

遺伝資源としてのマガキ地方集団について現在もっとも必要とされる管理項目は，他産地種苗の移入に関するものである。『平成11年漁業・養殖業生産統計年報』によると同年の日本のカキ種苗販売量は932,000連であり，仮にコレクター1枚あたり15gのカキが10個収穫可能であるとして換算すると，これは8,400tonの収穫量にあたる。採苗地域内で販売される種苗もあるであろうが，無視できない量の種苗が他海域に移入され続けるとすれば，移入先のカキはやがては元来の特性を失ってゆく危険性が高い。また，種苗の移入に際して病原生物や害敵生物が，いわゆるヒッチハイカーとして移入される危険性もある。採苗不良などによりどうしても他水域の地方集団の種苗を移入せざる得ない場合は，育種により作出された生物の養殖同様，養殖水域の地方集団との交雑をさける工夫が必要である。

次に問題となるのは再生産環境の保全に関するものである。マガキの再生産には，親貝が充分に成熟できる餌料と水温が確保されていること，台風や強風の吹送流による水温の急激な変化などの産卵刺激が存在すること，生じた幼生が成育する餌料と水域内に留まる水理条件が整っていること，などが必要と考えられる。環境適応能力の高いマガキは積極的な移植あるいは偶然の侵入により世界各地の沿岸に広がってゆき，このような条件を満たしている水域で再生産を繰り返している。しかし日本のマガキの主要産地である広島湾では，近年沿岸域での採苗が不安定なため殆どの種苗が島嶼部で採苗され，それは沿岸域の埋め立てによる干潟域の喪失や水質の悪化が原因であるとされている。再生産環境を保全してゆくためにはこれらの影響を的確に捉え，必要な措置を講じてゆく必要が有る。

環境の急激な改変や個体数の減少などにより遺伝資源としてのマガキを元来の生息環境の中で保存してゆくことが困難な場合，あるいは育種により作出された系統を効率的に長期間保存したい場合，配偶子や幼生の凍結保存が有効となる。本研究の第4章ではマガキの精子については液体窒素中で4年間保存した後も，新鮮精子に比較して受精率は劣るものの，D型幼生率や幼生の生残率は実用に耐えうる値であった。しかし，凍結に用いた容器であるストロー間でのばらつきが大きく，今後はその原因を探ってばらつきを小さくし，安定して使用できるようにすることが望まれる。一方，未受精卵や受精直後の卵の凍結保存は現在の方法では相当困難と思われたが，幼生の凍結保存では貝殻腺形成直前のトロコフォア期幼生を用いることで，わずかながら解凍後の幼生から付着稚貝が得られた。今後はさらに高率で付着稚貝を得るべく改良を進める必要がある。また，バイオアッセイや育種的研究の目的のためには受精能を保持したままで未受精卵が凍結保存できることが望まれる。一般に細胞や組織の凍結保存では細胞内の脱水が必要となるが，マガキの卵細胞は充分脱水するには大きすぎると考えられ，今後は新たな凍結手法の開発を行う必要がある。

第6章 要 約

日本の養殖マガキ種苗は宮城県，広島県などで天然採苗されている。広島県では養殖海域周辺で採苗され基本的に同一の地方集団が継続して養殖に利用されているが，必要種苗数が得られない場合，他海域から時

として相当量の種苗が移入される。これにより予想される遺伝的な混合・撹乱は将来の育種や遺伝資源の保存にとっても大きな危惧であり，その実態や天然集団の再生産に与える影響を予測し，適切な養殖過程や保全計画を考える必要がある。その基礎として，まず，現在の各海域の天然集団の形質の差を知る必要があり，さらに将来的には天然集団を素材とした選抜や交雑などによる育種をすすめてゆくことも必要となると考えられる。一般に選抜による品種改良では目的とする形質について遺伝率を推定することが選抜効果の予測に役立つとされる。また，交雑による品種改良を実行するには近縁種との交配特性を知る必要があり，これらの実行に関しても，その基礎として，遺伝資源としての天然集団の形質の差を知る必要がある。さらに，近縁種との交配特性等を明らかにすることは，交雑可能な近縁種が同所的に生息している海域での遺伝資源の動態の解明といった視点からも要求される。

マガキの各地方集団は本来の生息海域での再生産の維持という形で存続できるのが望ましいが，天然のマガキ地方集団の安定的な存続は決して約束されたものとは言えない。集団内の遺伝的多様性を完全に保持したまま本来の生息環境外で遺伝資源を長期的に保存することは殆ど不可能であるものの，凍結保存技術により最低限の遺伝資源を長期的に保存できる可能性はある。また，育種により作出した系統を保存するためにも配偶子や幼生の凍結保存は有用な手段と考えられる。

本研究は日本および諸外国のカキ養殖の最重要種であるマガキを中心に遺伝資源としての特性を評価するとともに，その保存方法を明らかにすることを目的とした。

1．地方集団間の特性比較

広島，宮城，有明，五島の各天然海域で採苗・採取した，履歴が異なる各母貝集団（P_0）と，これらから作出した各地方集団の次世代（P_1）を広島湾で養成し，成長，生残や形態等を比較することによりマガキ地方集団の遺伝資源としての特性を評価した。P_0，P_1とも全重量の増加速度は宮城産がもっとも大きく，有明産と五島産は小さかった。有明産P_1の稚貝は他産地のものに較べ殻表に棘状の突起や襞を持つ個体が多く観察され，稚貝期以降も殻高殻幅比が高く推移した。

ポケットカゴで養成した天然集団の斃死率は，有明産がもっとも低く，五島産がもっとも高く推移し，有明産は広島産との間で，五島産は宮城産との間で有意差はなかった。P_1の斃死率はポケットカゴ養成では産地間に明らかな差は無いがコレクター養成では五島産が他の産地よりも明らかに斃死率が高く，また，目合いが小さいザブトンカゴでの養成という悪条件下では有明産が他産地産よりも明らかに低い値を示した。殻内の軟体部の充実度を同じ個体について連続して追跡するためバイオマス比（全容積に対する麻酔後の容積の比率）を測定した結果，有明産のP_0は他産地が低い値を示した秋にも高い値を保持したが，P_1では，値は他産地よりも高いものの，他産地同様秋に低下した。これらのことより，日本のマガキ地方集団間では現在でもいくつかの形質に関して遺伝的な差異が存在していることが明らかとなった。

カキのような環境抵抗性（tolerance）が大きい生物の形質値は，環境による分散の幅が大きく，遺伝的差異を明確に把握できないこともある。本研究では宮城産と広島産のマガキ種苗を2つの水域で各々2垂下点，合計4垂下点で養成し，三元配置分散分析により種苗の産地（遺伝的要因），養成場所（環境的要因），測定月の各因子やそれらの交互作用が各形質に与える影響を検討した。その結果，形質によって各因子やそれらの交互作用からうける影響の大きさが異なることが明らかとなった。すなわち，多くの形質が産地と養成場所双方の影響を明らかに受けたが，殻幅／殻長，殻の密度，軟体部の水分含率，殻の水分含率は産地による影響が認められなかった。また，外套膜縁辺部色と殻内容積比（殻内容積／全容積）は養成場所よりも産地の影響を明らかに強く受け，殻幅／殻長と軟体部水分含率は反対に産地よりも養成場所の影響を明らかに強く受けた。さらに，産地×月や産地×養成場所の交互作用の影響，すなわち産地間の差の現れ方が測定月や養成場所により異なるかどうかは形質間で明瞭な違いがあることが明らかとなった。

2．近縁種との交配特性

過去の研究例から，有明海のカキ類には分類学的に識別困難な集団の存在が示唆され，遺伝資源としての系統の識別や人工種苗生産での親貝の選択時の混乱が危惧される。本研究ではマガキと非常に近縁であり，少なくともかつては有明海に存在したシカメを中心に，分子生物学的手法に基づいて有明海での生息の有無を確認した。また，マガキとシカメの塩基配列特性で識別した個体間の交配を行い，初期発生から稚貝までの特性を調査することによってシカメとマガキの間の交雑の可能性を検討した。

有明海から採取したカキの16SrRNA遺伝子の解析では，現在でも有明海にシカメと思われるカキが存在することを確認した。さらに，スミノエガキを含めた同所的に生息する*Crassostea*属3種の出現状況を調べ，これらの水平・垂直分布特性を河川，干潟，泥面から

の垂直距離に注目して論じた。また，これら天然カキの16SrRNA遺伝子とCaM intron 3の解析ではマガキとシカメの自然交雑が起こっている可能性があることが示唆された。交配実験ではCaM intron 3の型が互いに異なるmtシカメ型カキ（＝16SrRNA遺伝子がシカメ型を示すカキ）をマガキと交配することにより，自然交雑から生じると予想されるDNA型の稚貝が得られることが明らかとなった。この交配でのmtシカメ型カキの卵の初期発生は，雌親のCaM intron 3の型や，受精させた雄親の16SrRNA遺伝子，CaM intron 3の型に左右されず進むものと考えられた。また，従来受精しないと言われていたマガキ♀×シカメ♂の交配からも低率ながら稚貝が生じることが明らかとなり，さらに，マガキ♀×mtシカメ型カキ♂の組み合わせから得た稚貝の一部では雄親由来と思われるmtDNA型が検出され，精子のミトコンドリアが卵へ侵入することが示唆された。

3．遺伝率の推定

選抜育種での選抜効果の指標とするため，広島産と有明産のマガキ地方集団を親貝に用い，枝分かれ交配による半兄弟分散分析法により幼生期や稚貝期以降の遺伝率（狭義の遺伝率）を求めるとともに，異なる養成方法による遺伝率を求め，養成方法の違いが遺伝率推定に与える影響を検討した。

広島産，有明産ともに幼生期・稚貝期の殻長については父親成分からの遺伝率にくらべ母親成分からの遺伝率がかなり大きな値を示した。具体的な分散成分の大きさは不明ではあるが，観察成分の解釈から，これは用いた卵の質や飼育環境のかたよりなどの共通環境要因，あるいは遺伝子の優性効果などが大きく影響しているためと思われた。広島産マガキでは斃死率の遺伝率は全重量の遺伝率より大きな値を示し，有明産マガキでも斃死率は全重量よりも交配組間で大きな差があったことから，マガキの出荷初期までの生残率は全重量よりも高い選抜効果を期待できると考えられた。しかし，幼生期の成長・生残と付着期以降の成長・生残とは相関が低く，幼生段階で成貝期の成長・生残を予測するのは困難であると考えられた。また，アップウェリング養成では全重量や生残率について実験区の間の環境の差をカゴ養成より小さくすることが可能であるが，順調な成長には十分な流水量（ほぼ3L／分／筒以上）の確保が必須であることが示された。

4．精子と幼生の凍結保存

マガキ遺伝資源の保存方法の一つとして，精子と胚・幼生の凍結保存について検討した。

精子の凍結保存に関する凍害保護剤の種類と冷却方法の検討では，8％DMSO，50mMシュークロース及び6mM還元型グルタチオンを凍害保護剤とする希釈液を用い，液体窒素蒸気中で冷却する方法でもっとも高い浮遊幼生率が得られた。また，液体窒素蒸気中での3つの冷却条件を比較した結果，凝固潜熱の放出が緩やかな条件で冷却後に保存した精子で解凍後の生残率が高かった。しかし，凍結精子を用いて新鮮精子並みの受精率を得るためには，10^8精子/200μL以上の濃度で凍結した精子を1個の卵あたり10^3個以上の割合で媒精する必要があり，原精液の希釈は10～数10倍が限界と考えられた。液体窒素中で4年間保存した精子は，短期保存の精子に比べ低い生残率を示し，長期保存による精子の劣化が推察された。しかし，これから得た幼生の正常D型幼生率と飼育6日目の生残率は，新鮮精液を用いた場合より下回りはしたものの実用に耐えうる値であり，飼育6日目の幼生の殻長も新鮮区に劣らず，長期保存精子の実用性が確認された。

胚・幼生の凍結保存では，胞胚期から殻およびベラム形成中のトロコフォア幼生期までの耐凍性を検討し，貝殻腺形成直前のトロコフォア幼生期がもっとも耐凍性が高いことを明らかにした。凍害保護溶液中の海水に無希釈海水を用いた場合は解凍後に殻を形成する幼生は得られなかったが，1/4に希釈した海水を用いることにより殻を形成する幼生が得られた。さらに，幼生の凍結前の発生温度が解凍後の生残に影響することを示した。これらの結果，凍害保護剤として1.0MのDMSO，250mMのトレハロースを含む1/4濃度海水中に貝殻腺形成直前のトロコフォア幼生を浮遊させ，−1℃/minの速度で−35℃まで冷却し5分間そのままの温度で保持後液体窒素中に保存することにより，解凍後の幼生から付着稚貝を得ることができた。これらのことから，将来さらに技術的な検討を進めることにより，マガキ浮遊幼生の凍結保存法が確立できる可能性があることを示した。

謝　辞

本研究をとりまとめるにあたり，著者の遅筆にも関わらず懇切なるご指導を賜るとともに本論文を精細にご校閲いただいた東京大学海洋研究所教授 寺崎 誠博士には謹んで深謝いたします。また，本研究の遂行にあたり終始御指導・ご鞭撻を賜るとともに取りまとめの契機を与えて下さった養殖研究所繁殖生理部長 石岡宏子博士に心から御礼申し上げます。

東京大学農学部教授 黒倉 寿博士からは精子や幼生の凍結保存手法ついて，東京大学海洋研究所教授 西田

睦博士からは主に遺伝子解析の視点から示唆に富んだ御教示を賜りましたことを深謝いたします。また，東海大学海洋学部教授 沼知健一博士からはカキ研究の第一人者として，東京大学海洋研究所助教授 金子豊二博士からは主に生理学的視点から，貴重なご指摘とご助言を賜りましたことを厚く御礼申し上げます。

水産総合研究センター研究推進部の佐藤良三博士には遺伝率算出のための実験手法について丹念にご指導いただき，ここに感謝の意を表します。さらに，前瀬戸内海区水産研究所資源増殖部長 森岡泰啓博士ならびに瀬戸内海区水産研究所瀬戸内海区海洋環境部長 井関和夫博士には研究の各段階で様々なご配慮を頂き，厚く御礼申し上げます。

最後に，本研究は花村幸生博士および浜口昌巳博士を始めとする瀬戸内海区水産研究所の方々から頂いた多くの御支援と御協力，そしてマガキ研究の黎明期から精力的に著作を残してこられた諸先達の御精励の賜物と存じます。ここに記し，あらためて感謝の意を表します。

参考文献

Ahmed M., 1975: Speciation in living oysters. *Adv. Mar. Boil.* 13, 357-397

Allen S. K.Jr., Gaffney P. M., Scarpa J., and Bushek D., 1993: Inviable hybrids of *Crassostrea virginica* with *C. rivularis* and *C. gigas*. *Aquaculture*, 113(4), 269-289.

Amemiya I., 1928: Ecological studies of Japanese oysters, with special reference to the salinity of their habitats. *J. Coll. Agr. Univ. Tokyo*, **9**, 333-385.

Asahina E. and Takahashi T., 1979: Cryopreservation of sea urchin embryos and sperm. *Develop. Growth Differ*, **12(5)**, 423-430.

Banks M. A. and Hedgecock D., 1993: Discrimination between closely related Pacific oyster species (*Crassostrea*) via mitochondrial DNA sequences coding for large subunit rRNA. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, **2(3)**, 129-136.

Banks M. A., McGoldrick D. J., Borgeson W., and Hedgecock D., 1994: Gametic incompatibility and genetic divergence of Pacific and Kumamoto oysters, *Crassostrea gigas* and *C. sikamea* *Mar. Biol.*, **121(1)**, 127-135

Beattie J. H., Chew K. K., and Herchberger W. K., 1980: Differential survival of selected strains of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) during summer mortality. *Proc. Natl. Shellfish Assoc.*, **70**, 184-189.

Becker W. A., 1984: Manual of quantitative genetics, 4th ed. Academic Enterprises, Washington, 194pp.

Berthelin C., Kellner K., and Mathieu M., 2000: Histological characterization and glucose incorporation into glycogen of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* storage cells. *Mar. Biotechnol.*, **2(2)**, 136-145.

Bodoy A., 1993: The French experience in the management of oyster production. *FOID* **'93**, 41-53

Bogyo T. P. and Becker W. A., 1965: Estimates of heritability from transformed percentage sib data with unequal subclass numbers. *Biometrics*, **21**, 1001-1007

Bougrier S. and Rabenomanana L. D., 1986: Cryopreservation of spermatozoa of the Japanese oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture*, **58**, 277-280.

Buroker N. E., Hershberger W. K., and Chew K. K., 1979a: Population genetics of the family Ostreidae. I. Intraspecific studies of *Crassostrea gigas* and *Saccostrea commercialis*. *Mar. Biol.*, **54**, 157-169.

Buroker N. E., Hershberger W. K., and Chew K. K., 1979b: Population genetics of the family Ostreidae. II. Interspecific studies of the genera *Crassostrea* and *Saccostrea*. *Mar.Biol.*, **54**, 171-184.

Canapa A., Marota I., Rollo F., and Olmo E., 1999: The small-subunit rRNA gene sequences of Venerids and the phylogeny of bivalvia. J. Mol. *Evol.*, **48**, 463-468.

Carriker M. R., 1996: The Shell and Ligament, in "The Eastern Oyster *Crassostrea virginica*" (ed. by Kennedy V. S., Newell, R. I. E. and Eble A.) Maryland Sea Grant College, Maryland, pp.75-168.

Chao N-H., Lin T-T., Chen Y-J., Hsu H-W., and Liao I-C., 1997: Cryopreservation of late embryos and early larvae in the oyster and hard clam. *Aquaculture*, **155 (1-4)**, 31-44.

Chen C., Hsu H., and Lei S., 1989: Preliminary study on the cryopreservation of Pacific oyster oocytes. *J. Fish. Soc. Taiwan*, **16(3)**, 197-201

Cheney D. P., Macdonald B. F., and Elston R. A., 2000: Summer mortality of Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg): Initial findings on multiple environmental stressors in Puget Sound, Washington, 1998. *J. Shellfish Res.*,**19**(**1**) , 353-359.

Chow S., 1998: Universal PCR primer for calmodulin gene intron in fish. *Fish. Sci.*, **64**, 999-1000.

Côrte-Real H. B. S. M., Dixon D. R., and Holland P. W. H., 1994: Intron-targeted PCR: A new approach to survey neutral DNA polymorphysm in bivalve populations. *Mar. Biol.*, **120**(**3**), 407-413.

Crosby M. P. and Gale L. D., 1990: A review and evaluation of bivalve condition index methodologies with a suggested standard method. *J. Shellfish Res.*, **9**(**1**), 233-237.

Downing S. L., 1991: Hybridization, triploidy and salinity effects on crosses with *Crassostrea gigas* and *Crassostrea virginica*. *J. Shellfish Res.*, **10** (**1**), 302-303.

Falconer D. S., 1989: 量的遺伝学入門（原書第3版）（田中嘉成, 野村哲郎 共訳） 蒼樹書房, 東京, pp. 166.

Franks F., 1985: 低温の生物物理と生化学（村勢則郎, 片桐千仭 訳）, 北海道大学図書刊行会, 札幌, 182

Galtsoff P. S., 1964: The American oyster, Fishery bulletin of the fish and wildlife service Vol. 64, Washington.

Geller J. B., 1994: Sex-specific mitochondrial DNA haplotypes and heteroplasmy in *Mytilus trossulus* and *Mytilus galloprovincialis* populations. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, **3**(**6**), 334-337.

五嶋聖治, 藤芳義裕, 中尾 繁, 1995: サロマ湖湖底に見られるカキ礁遺骸：その形成年代と生息環境. 日本ベントス学会誌, **48**, 41-48.

Guo X., Ford S. E., and Zhang F., 1999: Molluscan aquaculture in China. *J. Shellfish Res.*, **18**(**1**), 19-31.

Gyllensten U., Wharton D., Josefsson A., and Wilson A. C., 1991: Paternal inheritance of mitochondrial DNA in mice. *Nature*, **352**, 255-257.

Hadley N. H., Dillon R. R., and Manzi J. J., 1991: Realized heritability of growth rate in the hard clam *Mercenaria mercenaria*. *Aquaculture*, **93**(**2**), 109-119.

Hedgecock D., Cooper K., Hershberger W., and Guo X., 1993: Body size at harvest, sex ratio, and mantle color of pedigreed Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) from controlled crosses. *Aquaculture*, **111**(**1-4**), 299.

Hedgecock D., 1995: The cupped oyster and the Pacific oyster, in " Conservation of Fish and Shellfish Resources － Managing Diversity －" edt. by Thorpe J., Gall G., Lannan J., and Nash C., Academic Press, London, pp. 115-136.

Héral M. and Deslous-Paoli J. M., 1990: Oyster culture in European countries, in " Estuarine and Marine Bivalve Mollusk Culture " edt. by Menzel W., CRC Press, Boston, pp. 153-190.

Hirase S., 1930: On the classification of Japanese oyster. *Jap. J. Zool.*, **3**, 1-65.

Hori J. and Kusakabe D., 1926: Preliminary experiments on the artificial culture of oyster larvae. *J. Imp. Fish. Ins.*, Tokyo, **22**, 177-188.

Imai T. and Sakai S., 1961: Study of Breeding of Japanese Oyster, *Crassostrea gigas*. *Tohoku J. Agr. Res.*, **12**(**2**), 125-171.

稲葉明彦, 1993: カキの分類形質と日本のカキ. 九州の貝, **40**/**41**, 27-32.

岩川友太郎, 1919: Catalogue of Japanese mollusca in the Natural history department. Tokyo Museum.

岩槻邦男, 馬渡峻輔, 1996: 生物の種多様性, 裳華房, 東京, 342pp.

岩田仲弘, 黒倉 寿, 平野禮次郎, 1989: マガキ精液の凍結保存. 水産増殖, **37**(**3**), 163-166.

Jarayabhand P., 1995: Realized heritability estimation on growth rate of oyster, *Saccostrea cucullata* Born 1778. *Aquaculture*, **138**(**1-4**), 111-118.

小金沢昭光, 1978: マガキの種苗生産に関する生態学的研究. 日水研研報, **29**, 1－88.

上田真久, 2000: PINE分析を利用したサケ科魚類の交雑集団の同定. 水産育種, **29**, 25-36.

Kurokura H., Namba K., and Ishikawa T., 1990: Lesions of spermatozoa by cryopreservation in oyster *Crassostrea gigas*. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **56**(**11**), 1803-1806.

日下部台次郎, 1931: 垂下式養殖牡蠣の斃死について. 水産物理談話会会報, **22**, 303-312.

Kusuki Y., 1990: Oyster culture in Japan and adjacent countries: *Crassostrea gigas* (Thunberg), in "Estuarine and Marine Bivalve Mollusk Culture "edt. by Menzel W., CRC Press, Bosnton, pp.

227-243.

楠木　豊, 1977: マガキの成育とクロロフィルａ量との関係. 広島水試研報, **9**, 28-36.

Lannan J. E., 1972: Estimating heritability and predicting response to selection for the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Proc. Natl. Shellfish. Assoc.*, **62**, 62－66.

Lannan J. E., 1971: Experimental self-fertilization of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, utilizing cryopreserved sperm. *Genetics*, **68**, 599-601.

Lannan,J. E., Robinson A., and Breese W. P., 1980: Broodstock management of *Crassostrea gigas*. Ⅱ. Broodstock conditioning to maximize larval survival. *Aquaculture*, **21**, 337-345.

Lindemann C. B., O'Brien J. A., and Giblin F. J., 1988: An investigation of the effectiveness of certain antioxidants in preserving the motility of reactivated bull sperm models. *Biol. Repr.*, **38**, 114-120.

Liu X. and Robinson A. M., 1997: Impact of cryoprotectants dimethyl sulfoxide, ethylene glycol, methanol, glycerol, sucrose and polyvinylpyrolidone on oyster (*Crassostrea gigas*) embryos before freezing. *J. Shellfish Res.*, **16**(**1**), 310.

Losee E., 1979: Relationships between larval and spat growth rates in the oyster (*Crassostrea virginica*). *Aquaculture*, **16**,123-126.

Masumoto B., Masumoto M., and Hibino M., 1934: Biochemical studies of Magaki (*Ostrea gigas* Thuberg),II. The seasonal variation in the chemical composition of *Ostrea gigas* Thunberg. *J. Sci. Hiroshima Univ.*, **A4**, 47-56.

森　勝義, 今井丈夫, 豊島清明, 臼杵　格, 1965a: 松島湾におけるカキの大量斃死に関する研究　Ⅳ. 性成熟及び産卵に伴うカキの生理活性と糖原料の変化. 東北水研研報, **25**, 49-63.

Mounib M. S., 1978: Cryopreservation of fish and mammalian spermatozoa. *J. Reprod. Fert.*, **53**, 13-18.

向井輝美, 1978: 集団遺伝学, 講談社, 東京, pp. 6-7.

Na-Nakorn U., Sidthikraiwong P., Tarnchalanukit W., and Roberts T., 1993: Chromosome study of hybrid and gynogenetic offspring of artificial crosses between members of the catfish families Clariidae and Pangasiidae. *Env. Biol. Fish.*, **37**(**3**), 317-322.

Newkirk G. F., 1980: Review of the genetics and the potential for selective breeding of commercially important bivalves. *Aquaculture*, **19**, 209-228.

Newkirk G. F. and Haley L. E.,1983: Selection for growth rate in the European oyster, *Ostrea edulis* : Response of second generation groups. *Aquaculture*, **33**, 149-155.

Newkirk G. F., Haley L. E., Waugh D. L., and Doyle R. 1977: Genetics of larvae and spat growth rate in the oyster *Crassostrea virginica*. *Mar. Biol.*, **41**, 49-52.

日本水産資源保護協会, 1995: 日本の希少な野生水生生物に関するデータブック（水産庁編), pp.1-60.

沼知健一, 1971: Ⅱ.カキ養殖の進歩　第１章 カキの生物学的研究　§2. 分類および分布,「浅海養殖」, 恒星社厚生閣, 東京, pp.83-90.

沼知健一, 1979: 無脊椎動物, 水産学シリーズ26『水産生物の遺伝と育種』, 恒星社厚生閣, 東京, pp. 93-113.

小笠原義光, 1959:　『牡蠣の養殖』　pp.86

小笠原義光, 小林歌男, 岡本　亮, 古川　厚, 久岡　実, 野上和彦, 1962: カキ養殖における抑制種苗の使用とその生産的意義. 内海区水研研報, **19**, 1-53.

Okoshi K., Mori K., and Nomura T., 1987: Characteristics of shell chamber formation between the two local races in the Japanese oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquaculture*, **67**, 313-320.

Ozaki H., and Fujio Y., 1985: Genetic differentiation in geographical population of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) around Japan. *Tohoku J. Agri. Res.*, **36**(**1**), 49-61.

Quayle D. B., 1988: Pacific oyster culture in British Columbia, Department of Fisheries and Oceans, Ottawa, 241pp.

Renard P., 1991: Cooling and freezing tolerances in embryo of the Pacific oyster , *Crassostrea gigas* : methanol and sucrose effects. *Aquaculture*, **92**, 43-57.

Robinson A., 1992: Gonadal cycle of *Crassostrea gigas kumamoto* (Thunberg) in Yaquina bay, Oregon and optimum conditions for broodstock oysters and larval culture. *Aquaculture*, **106**(**1**), 89-97.

Saavedra C., Reyero M. I., and Zouros E., 1997: Male-dependent doubly uniparental inheritance of mitochondrial DNA and female-dependent sex-ratio in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Genetics*, **145**(**4**), 1073-1082.

Saavedra C., Stewart D. T., Stanwood R., and Zouros E., 1996: Species-specific segregation of gender-associated mitochondrial DNA types in an area where two mussel species (*Mytilus edulis* and *M. trossulus*) hybridize. *Genetics*, **143**(**3**), 1359-1367.

佐賀県有明水産試験場, 1985: 3.特産魚介類の生態とその利用－3)二枚貝類「昭和58・59年 組織的調査研究活動推進事業報告書 有明海特産魚介類の振興に関する研究 昭和60年3月」, 佐賀県

坂本幸哉, 木下祝郎, 1989: グルタチオン, 講談社, 東京, pp. 5.

佐々木義之, 1994: 動物の遺伝と育種, 朝倉書店, 東京, pp. 84.

四之宮重穂, 1989: 動物精液の凍結保存法－馬,「凍結保存－動物・植物・微生物－」(酒井昭編), 朝倉書店, 東京, pp. 146-147.

Skibinski D. O., Gallagher F. C., and Beynon C. M., 1994: Sex-limited mitochondrial DNA transmission in the marine mussel *Mytilus edulis*. *Genetics*, **138**(**3**), 801-809.

僧都 博, 1989: 微生物の凍結および乾燥障害と耐性,「凍結保存－動物・植物・微生物－」(酒井昭編), 朝倉書店, 東京, pp. 23-29.

Strömgren T. and Nielsen M. Y. 1989: Heritability of growth in larvae and juveniles of *Mytilus edulis*. *Aquaculture*, **80**, 1-6.

高槻俊一, 1949 :牡蠣, 技報堂, 東京, pp.33.

武岡英隆, 1985 :瀬戸内海の密度成層. 海と空, **60**(**3**), 145-152.

滝 巌, 1933: 有明海産スミノエガキおよびマガキ(方言シカメ)の種の異同に関する藤森三郎氏の報告書を読みて. *Venus* , **3**, 365-377.

Thiriot-Quiévreux C., Noel T., Bourgrier S., and Dallot S., 1988: Relationships between aneuploidy and growth rate in pair matings of the oyster *Crassostrea gigas*. *Aquaculture*, **75**, 89-96.

Thorpe J., Gall G., Lannan J., and Nash C., 1995: Conservation of Fish and Shellfish Resources: managing diversity, Academic Press, New York. 206pp.

Toledo J. D., Kurokura H., and Kasahara S., 1989: Preliminary studies on the cryopreservation of the blue mussel embryos. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **55**(**9**), 1661.

Torigoe K., 1978: Electrophoretic variants of adductor muscle proteins in *Crassostrea gigas*. *Venus*, **37**(**4**), 241-244.

Torigoe K., 1981: Oysters in Japan. *J. Sci. Hiroshima Univ., Ser. B, Div. 1* (*Zool.*), **29**, 291-319.

Toro J. E., 1995: Response to artificial selection and realized heritability estimates for live weight and shell length for Chilean native oyster (*Ostrea chilensis philippi* 1845). *Aquaculture*, **137**, 271-272.

Toro J. E. and Newkirk G. F., 1991: Response to artificial selection and realized heritability estimate for shell height in the Chilean oyster, *Ostrea chilensis*. *Aquat. Living Resour.*, **4**(**2**), 101-108.

和田克彦, 1984: アコヤガイ *Pinctada fucata* の改良に関する研究. 養殖研研報, **6**, 79-157.

Wada K. T. and Komaru A., 1994: Effect of selection for shell coloration on growth rate and mortality in the Japanese pearl oyster, *Pinctada fucata martensii*. *Aquaculture*, **125**(**1-2**), 59-65.

脇谷洋次郎, 1910: マガキとナガガキ. 動物学雑誌, **22**, 491.

Xue Q., 1994: Cryopreservation of embryo of scallop, *Chlamys farreri*, in liquid nitrogen. *Mar, Sci.*, **4**, 44-47.

Yankson K. and Moyse J., 1991: Cryopreservation of the spermatozoa of *Crassostrea tulipa* and three other osyters. *Aquaculture*, **97**, 259-267.

Zouros E., Freeman K. R., Ball A. O., and Pogson G. H., 1992: Direct evidence for extensive paternal mitochondrial DNA inheritance in the marine mussel *Mytilus edulis*. *Nature*, **359**, 412-414.

和文要旨

亜熱帯性の海草のシュート密度，シュート構造，摂餌痕の地域変異（報文）

高田宜武（西海区水産研究所石垣支所）
阿部　寧（西海区水産研究所石垣支所）

八重山諸島沿岸の海草の種組成，現存量，シュート密度，シュート構造，および摂餌痕の地域変異を調べた。4地点で7種類の海草を採集した。現存量に地域差はなかったが，大型3種のシュート密度とシュート構造に違いがあった。シュート密度の低い地点では，リュウキュウスガモの葉数は少なく，葉長などは長かった。摂餌痕の頻度に地域差があったが，葉長組成の違いとは対応しなかった。今後は成長や被食量を調べる必要がある。

No. 4, 1-10 (2002)

ヒラメ稚魚の成長と摂餌量の関係に与える体重と水温の影響（報文）

福田雅明（中央水産研究所海区水産業研究部）
佐古　浩（中央水産研究所）
重田利拓・柴田　玲（瀬戸内海区水産研究所）

天然海域におけるヒラメ稚魚の食物要求量を算定するための基礎資料を得る目的で，6階級の体重グループ（7.5g～337g）および3種類の水温（15, 20, 26℃）における成長と摂餌量の関係について飼育実験を行った。成長率（体重増加量g/日）と摂餌率（kcal/日）には，6体重階級および3水温のどれにおいても有為な直線関係が認められた。成長率と摂餌率の関係から得られる回帰直線の傾き（転換効率）および切片（体維持に必要なエネルギー量）と体重，水温の関係を基に成長率（G）と摂餌率（R）との間に以下の関係式が得られた。

$$R=0.007\times e^{0.054T}W^{0.75}+1.47W^{0.10}G$$

ここで，Rは日間摂餌量（kcal/日），Gは日間成長率（体重増加量g/日），Wは体重（g），Tは水温（℃）である。

No. 4, 11-18 (2002)

サザエ*Turbo (Batillus) cornutus*とコシダカサザエ*Turbo (Marmarostoma) stenogyrus*の原殻形態の比較（報文）

河野悌昌（瀬戸内海区水産研究所）
山川　紘（東京水産大学）

着底後から殻高2.5mm未満におけるサザエ*Turbo (Batillus) cornutus*とコシダカサザエ*Turbo (Marmarostoma) stenogyrus*の査定方法を確立するため，原殻の長径，短径，口径および電子顕微鏡観察による原殻の表面構造の比較を行った。全ての計測部位においてサザエよりもコシダカサザエの方が長かった。例えば，後生殻が原殻の周りを一巻きした後における原殻の平均長径はサザエで267μm，コシダカサザエで303μmであった。また走査型電子顕微鏡によって原殻の表面構造を観察した結果，種ごとの特性が認められ，これらの違いに基づいて両種を区別することが可能となった。

No. 4, 19-24 (2002)

水産総合研究センター研究報告
Bulletin of Fisheries Research Agency

編集委員会
編集委員長　中添純一
編集委員　原　一郎，奥田邦明，中野　広，山澤正勝，石塚吉夫，山田　久，
芦田勝朗，反町　稔，山越康行

平成14年9月30日　発　行

発　行　所　独立行政法人　水産総合研究センター
〒236-8648　神奈川県横浜市金沢区福浦2-12-4
Fisheries Research Agency
Fukuura 2-12-4, Kanazawa-ku, Yokohama, Kanagawa 236-8648, Japan
http://www.fra.affrc.go.jp

発　行　者　畑中　寛

印　刷　所　株式会社 シーケン

ISSN 1346-9894

BULLETIN OF
FISHERIES RESEARCH AGENCY

No. 4
September 2002

Bull.Fish.Res.Agen.

CONTENTS

Original Paper

Local variations in shoot density, shoot morphology, and bite mark frequency of subtropical seagrasses in Japan
Yoshitake TAKADA and Osamu ABE 1

Effects of body size and temperature on the relationship between growth and ration of young Japanese flounder, based on laboratory experiments
Masaaki FUKUDA, Hiroshi SAKO, Toshihiro SHIGETA, and Rena SHIBATA 11

Comparison of larval shell morphology of two coastal turbinid snails, *Turbo(Batillus) cornutus* and *Turbo (Marmarostoma) stenogyrus* (Vetigastropoda: Turbinidae)
Naoaki KONO and Hiroshi YAMAKAWA 19

Total amount of carbon and nitrogen in *Zostera marina* in Hiroshima Bay, western Seto Inland Sea, Japan
Toshinobu TERAWAKI, Hitoshi TAMAKI, Masaki NISHIMURA, Koji YOSHIKAWA, and Goro YOSHIDA 25

The meiobenthic community on the tidal flat of Miyajima in Hiroshima Bay, with special reference to the biomass of free-living nematodes
Mutsumi TSUJINO, Goro YOSHIDA and Takuji UCHIDA 33

Doctoral Thesis

Evaluation of characteristics and preservation of Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in view of the genetic resources
Hironori USUKI 40

Abstract (Japanese) 105